

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 895 084 A2**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(43) Date of publication:  
03.02.1999 Bulletin 1999/05

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **G01N 33/558**, G01N 33/53

(21) Application number: 98112964.6

(22) Date of filing: 13.07.1998

(84) Designated Contracting States:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Designated Extension States:  
AL LT LV MK RO SI

(30) Priority: 25.07.1997 US 900586

(71) Applicant: **Bayer Corporation**  
Pittsburgh, PA 15205-9741 (US)

(72) Inventors:  
• Kuo, Hai-Hang  
Granger, Indiana 46530 (US)

- Miller, Carol A.  
Elkhart, Indiana 46514 (US)
- Wijesuriya, Dayaweere  
Granger, Indiana 46530 (US)
- Yip, Meltak Teresa  
Elkhart, Indiana 46516 (US)
- Zimmerle, Chris T.  
Goshen, Indiana 46528-8313 (US)

(74) Representative:  
Drope, Rüdiger, Dr. et al  
Bayer AG  
Konzernbereich RP  
Patente und Lizenzen  
51368 Leverkusen (DE)

**(54) Device and method for obtaining clinically significant analyte ratios**

(57) Disclosed is a method for determining the concentration of an analyte in a sample of body fluid. The method involves contacting the body fluid sample with a test strip containing mobile, labeled specific binding partner for the analyte, through which strip the test fluid, analyte and any complex formed by interaction of the analyte and labeled specific binding partner therefore can flow by capillarity. The strip contains at least one zone for capture of the labeled specific binding partner and at least one separate zone for retention of the analyte/labeled specific binding partner complex. By determining the magnitude of the signal from the detectable label in the capture zone(s) and retention zone(s) and determining a final response signal by correlating signals using an algorithm and number of zones chosen in a manner that provides a final response signal best suited for the particular assay, the concentration of the analyte can be determined with greater precision.

**EP 0 895 084 A2**

**Description****Background of the Invention**

[0001] Immunochromatographic strip formats have become increasingly popular for qualitative and semi-quantitative assays which use visual detection schemes. This type of immunoassay involves the application of a liquid test sample suspected of containing an analyte to be detected to an application zone of an immunochromatographic test strip. The strip is comprised of a matrix material through which the test fluid and analyte suspended or dissolved therein can flow by capillarity from the application zone to a capture zone where a detectable signal, or the absence of such, reveals the presence of the analyte. Typically, the strip will include means for immunospecifically binding the analyte to be detected with its specific binding partner which bears the detectable label. In one such scheme, as disclosed in U.S. Patent 4,446,232; the strip contains an enzyme labeled, mobile binding partner for the analyte which is in a zone downstream from the sample application zone. If analyte is present in the test sample, it will combine with its labeled binding partner to form a complex which will flow along the strip to a detection zone which contains a substrate for the enzyme label which is capable of providing a colored response in the presence of the enzyme label. The strip may contain a zone in which analyte is immobilized, so that labeled binding partner which does not combine with analyte, due to the absence of analyte in the sample, will be captured and thereby inhibited from reaching the detection zone. There have been published various modifications of this technique, all of which involve some competitive specific binding system in which the presence or absence of analyte in the test sample is determined by the detection or lack thereof of labeled binding partner in the capture zone.

[0002] An alternative to the above described immunometric assay which detects the free labeled antibody is the so called sandwich format in which the capture zone contains immobilized antibodies against an epitope of the analyte which is different than the epitope to which the labeled antibody is specific. In this format, there is formed a sandwich of the analyte between the immobilized and labeled antibodies and it is therefore an immunometric assay which detects the bound labeled antibody species.

[0003] Not all of the schemes for immunochromatography rely on an enzyme labeled binding partner/enzyme substrate for providing the signal for detection of the analyte. In U.S. Patent 4,806,311 there is disclosed a multizone test device for the specific binding assay determination of an analyte and an immobilized binding partner therefore together with a capture zone for receiving labeled reagent which migrates thereto from the reagent zone. The capture zone contains an immobilized form of a binding substance for the labeled reagent. The labeled reagent bears a chemical group having a detectable physical property which is detectable on the basis of its own physical properties, so that it does not require a chemical reaction with another substance. Exemplary of such groups are colored species of fluorescers, phosphorescent molecules, radioisotopes and electroactive moieties.

[0004] United States Patent 4,703,017 describes the use of visible particulate labels for the receptor. Various particulate labels such as gold sol particles and visible dye containing liposomes are mentioned.

[0005] In WO-96/34271 there is disclosed a device for determining a target analyte and creatinine in a fluid test sample which device has an assay strip for the detection of creatinine and a second assay strip for the detection of the target analyte. The creatinine concentration may be determined colorimetrically or by the specific capture of labeled creatinine binding partners. The concentration of the target analyte is corrected based on the sample's creatinine concentration which correction can either be done manually or by means of a properly programmed reflectance analyzer.

[0006] EP 0 462 376 A<sub>2</sub> discloses an immunochromatographic procedure in which signal at the capture site and the conjugate recovery site of the strip are detected and the analyte concentration is determined by the intensity of the signal at the capture site relative to the signal at the conjugate recovery site. Also of interest in this regard is U.S. Patent 5,569,608.

[0007] Immunochromatographic strip formats provide a viable system for the determination of various analytes (whether they be antigens or antibodies) but suffer from the limitation that they yield results which are at best semi-quantitative when, for some analytes, more precise, quantitative results are required. Accordingly, it would be desirable and it is an object of the present invention to provide a means for quantifying the results of analyses carried out by the use of immunochromatographic strip formats.

**Summary of the Invention**

[0008] The present invention involves a method for determination of an analyte in a sample of body fluid which comprises the steps of:

- a) providing a test strip comprising a matrix through which the fluid sample can flow by capillarity, said strip having a first region which contains mobile specific binding partner for the analyte which binding partner bears a detectable label and can react with the analyte to form an analyte/labeled binding partner complex, at least one second

region which contains immobilized analyte or an immobilized binding partner which is specific for an epitope of the analyte different than that to which the labeled binding partner is specific, at least one third region which contains means for capturing the analyte/labeled specific binding partner complex which is not bound in the second region and a fourth region which contains means for producing a detectable signal the intensity of which corresponds to the level of a second analyte whose concentration is clinically related to that of the analyte whose concentration in the body fluid is being determined;

b) developing the matrix by applying a sample of a body fluid suspected of containing the first and second analytes thereto thereby allowing it to contact the labeled specific binding partner so that the analyte present in the fluid sample binds to the labeled specific binding partner to form a complex while leaving excess, unreacted labeled binding partner free to further react whereby the fluid sample carries the analyte/labeled partner complex and unreacted labeled binding partner along the matrix by capillarity to the second region containing the immobilized analyte in which region unreacted labeled binding partner is bound to the immobilized analyte in inverse relationship to the concentration of the first analyte in the fluid test sample or is bound to the immobilized specific binding partner in a direct relationship to the concentration of analyte in the fluid test sample; and the labeled specific binding partner which did not bind to the second region is carried by capillarity to the third region where it is captured by the capture means;

c) reading the second zone of the developed matrix on an instrument having a detector capable of measuring the signal from the detectable label to determine the concentration of the labeled binding partner in the second zone and reading the third zone of the developed strip in a similar manner to determine the signal from the labeled binding partner in the third zone of the matrix;

d) determining a final response signal by ratioing the signals from the labeled binding partner immobilized in the second region and the labeled binding partner captured in the third region;

e) determining the concentration of the first analyte in the fluid sample by comparing the final response signal determined in step (d) with final response signals determined in a similar manner for fluid samples containing known concentrations of the first analyte;

f) correcting the concentration of the first analyte determined in step (e) by determining the concentration of the second analyte in the fluid test sample by measuring the intensity of the signal in the fourth region of the matrix and converting this to a concentration value of the second analyte and then determining the ratio of the second analyte to the first analyte whose quantitative concentration is being sought.

#### **Description of the Invention**

[0009] The present invention is practiced by first providing the test matrix through which the fluid test sample can flow by capillarity. Typically, the matrix will be in the form of a strip through which the test fluid flows horizontally. While the matrix could be assembled in a layered format through which the test fluid could flow vertically from top to bottom or vice-versa, the following discussion is focused on the preferred strip format.

[0010] The strip can be prepared from any matrix material through which the test fluid and an analyte contained therein can flow by capillarity and can be of a material which is capable of supporting non-bibulous lateral flow. This type of flow is described in U.S. Patent 4,943,522 as liquid flow in which all of the dissolved or dispersed components of the liquid are carried through the matrix at substantially equal rates and with relatively unimpaired flow, as contrasted to preferential retention of one or more components as would be the case if the matrix material were capable of absorbing or imbibing one or more of the components. An example of such a matrix material is the high density or ultra high molecular weight polyethylene sheet material from Porex Technologies. Equally suitable for use as the matrix from which the chromatographic strips can be fabricated are bibulous materials such as paper, nitrocellulose and nylon.

[0011] Various immunochromatographic strip formats are suitable for use in conjunction with the present invention. A particularly suitable format is that which is disclosed in U.S. Patent 4,446,232 in which there is described a device for the determination of the presence of antigens, which device comprises a strip of matrix material having a first zone in which there are provided immobilized analyte and enzyme linked antibodies specific to the analyte to be determined. The labeled antibodies can flow to a second zone when reacted with analyte introduced into the first zone via the test sample but will not so flow in the absence of analyte in the test fluid due to their being bound in the first region by interaction with the immobilized analyte. The analyte is typically antigen, although the format can be designed to detect the presence of antibodies as analyte. Modifications to this format are disclosed in U.S. Patent 4,868,108. In another mod-

ification, the enzyme substrate is disposed in the region of a second, immobilized antibody to thereby capture the complex formed between the enzyme labeled binding partner and the analyte. This sort of format is particularly suitable for adaptation to the present invention, although any physically detectable signal generator may be used as the label since the present invention need not be limited to the interaction of an enzyme and its substrate to provide the detectable signal. Thus, by immobilizing the conjugate in a discrete detection zone located downstream on the strip from the zone in which the labeled binding partner for the analyte is captured, there are provided two regions from which the physically detectable property of the label can be measured to determine its concentration. By measuring the signal from the detectable label in the second region of the matrix (sometimes referred to as the capture zone) and the signal from the physically detectable property of the label in the third region (sometimes referred to as the detection zone), in which an immobilized antibody against the labeled binding partner (e.g. anti-mouse IgG when the labeled binding partner is an antibody) is the capture means, and determining the ratio of these signals, the accuracy of the test for analyte concentration can be increased. The accuracy is increased because this technique corrects for inaccuracies in labeled conjugate deposition and/or non-uniform flow through the matrix. More particularly, since the aforementioned inaccuracies of labeled conjugate deposition and non-uniform fluid flow are usually of small but significant magnitude, they do not substantially disturb the binding equilibrium. Therefore the ratio of the signals in the two binding regions is a more accurate measure of the analyte concentration than is the signal from either region by itself. This principle applies with equal force when the previously described sandwich format is used.

[0012] The second and third zones of the matrix used in the present invention may each be divided into two or more bands with the second region preferably containing 1 to 3 discrete bands and the third region having 1 to 2 bands. By dividing these regions into bands it is possible to increase the dynamic range and/or precision of the assay due to the non-linearity of reflectance to the number of detected labeled binding partners. Dividing the regions into discrete bands can be desirable because the measurement of small changes in detected labeled binding partner is more robust at higher values of reflectance than at low values. The number of capture and/or collection bands which are desirable will depend on the particular assay for which the strip is designed since dividing the capture and collection zones into 2 or more discrete bands will increase the dynamic range of certain assays but not of others. Dynamic range refers to the fact that the overall signal can be increased if one focuses on more than a single capture or detection band within a zone. Thus, when the detectable label is one which is detectable by a reflectance meter, there can be a large nonlinearity of reflectance and the error associated with the reflectance meter used. For example, the difference between 70%R and 75%R represents a fairly small amount of detected label whereas the difference between 30%R and 35%R represents a high percentage of detected label. With the use of certain reflectance meters, the error in reflectance reading stays constant or increases as the reflectance value decreases. Thus, it can be advantageous to use one or more additional capture or detection bands if this places the reflectance reading at a higher value where it is more sensitive to particle concentration. In those assays in which a wide dynamic range is not necessary, simply reading and ratioing a single capture and a single detection region can give good quantitative results. This is illustrated by the following Example 1 in which deoxypyridinoline is the first analyte, the capture zone is divided into 3 bands ( $P_1$ ,  $P_2$  and  $P_3$ ) while the detection zone is a single band ( $P_4$ ) and the decode algorithm for the DPD assay is  $T/P_n$  where T is the summation of the signal from all four bands. Algorithms using these reagent band reflectance values are constructed in such a way as to maximize the signal to noise ratio and thereby increase the quantitation of the assay by reducing coefficients of variation (CV). The particular algorithm chosen will depend upon the number of reagent bands on the particular test strip being used and the sensitivity and/or precision of the assay. Once the appropriate algorithm is chosen, the relationship between the algorithm value and the analyte concentration is determined and fitted to a non-linear regression function. The purpose of such fitting is to minimize the error relating the chosen algorithm value to that of the analyte concentration. The regression function is used in order to determine a calibration curve which is used to relate the determined algorithm value to that of the analyte concentration. Once this relationship has been established, the calibration curve, which can be stored as an equation in the reflectance instrument, is used to calculate the analyte concentration.

[0013] Since the capture and detection zones' reflectance changes opposite to one another, i.e. the greater the signal from the capture zone the less the signal from the detection zone, the use of multiple capture and/or detection bands is designed to alter this range of reflectance values. The mechanism by which analyte concentration changes the band's reflectance is a function of the chemistry of a particular assay. For sandwich assays, with increasing analyte concentration, the capture band reflectance increases and the detection band reflectance decreases. For competitive assays, the capture band reflectance decreases and detection band reflectance increases with increasing amounts of analyte in the fluid test sample.

[0014] The need for additional capture and/or detection bands depends on whether changes in an additional band are significantly larger in a given analyte region than in any of the other bands. Depending upon the label (i.e. gold sol) concentration, additional capture bands will also reduce the signal changes at the detection zone. In certain assays, a second capture band simply mirrors the first capture band but with reduced signal changes, and, in such cases, its need can be questioned. However, in those assays in which the detection zone is too dark due to low reflectance, the addition

of capture bands can reduce the signal in this zone.

[0015] In general, the crux of the present invention involves choosing a particular algorithm and additional capture and/or detection bands so as to alter the signal in such a way that it can be read with greater precision by a reflectance meter.

[0016] There are two steps involved in developing an appropriate algorithm. The first is to increase the signal to noise ratio to as high a level as possible. The second is to define an algorithm which easily fits an equation so that accurate values for any analyte concentration may be obtained. This is demonstrated by the following study involving a strip containing three bands (2 capture bands and one detection band). The two capture bands had different capture reagent concentrations with the first capture band having a 10-fold lower capture reagent concentration than the second. This format demonstrates that different combinations and concentrations of capture and collection bands can be used depending upon the unique properties of each assay. Data were taken (representing N=18 for each analyte level) using 3 different CLINITEK<sup>®</sup> 50 reflectance meters over a period of 2 days. Table 1 shows the Figure of Merit (FOM) differences between DPD levels of the various band reflectance changes and the use of various reflectance changes and the use of various algorithms. The FOM is calculated as  $(\text{Avg1}-\text{Avg2})/(\text{SD1}+\text{SD2})$  where Avg1 and Avg2 are the mean measured values for analyte level 1 and analyte level 2 and SD1 and SD2 are the standard deviations of the mean values for analyte level 1 and analyte level 2.

**TABLE 1**

	%R change		FOM				
	Cap 1	Col 1	Capture 1	Detection 1	Cap1 / Det 1	Algor 1	Total/Cap1
0 to 10	3.8	6.1	1	1.39	1.56	1.94	2.07
10 to 25	4.6	5.9	1.21	1.51	2.51	2.08	2.12
25 to 50	4.9	5	1.38	1.39	2.18	2.22	2.39
50 to 75	5.1	2	1.5	0.48	1.98	1.99	1.94
75 to 150	7.1	3.6	2.37	0.84	2.07	3.05	2.91
150 to 250	2.1	1.7	0.72	0.49	1.18	1.06	0.93

[0017] In Table 1, Capture 1 is the IR corrected reflectance data for the Capture 1 band, detection band 1 is the IR corrected reflectance data for detection band 2, Cap1/Det1 is the K/S transformed data of Capture 1 divided by Detection 1 and Algor 1 is:

$$C/(\text{Capture Band 2}/\Sigma \text{ Capture Bands}) * \text{ABS}(2-C)$$

where  $C = 100 * (1 + \Sigma (\text{Detection Bands}/\Sigma \text{ Reagent Bands}))$  and Total/Cap1 as:

$$\Sigma (\text{All Bands}) / \text{Capture 1}$$

where ABS represents the absolute value of the number. In this illustration, the detection band performance decreases as the DPD concentration increases, whereas larger signal changes are noted for the capture band. For any algorithm, the goal is to weight the reflectance values in such a way that the signal to noise ratio in the region most critical to the assay is maximized. This can be accomplished by use of FOM analysis and Algor 1 is designed to weight the differences of the two capture bands higher at low analyte concentrations where this difference is greatest with that weighting of the collection band over the total at higher analyte concentrations. The other goal of Algor 1 is to place this weighting in a way which allows fitting to a common four parameter fit used in many immunoassays.

[0018] The second step in algorithm development is to use an equation which can be easily fitted and give accurate analyte concentrations for in between values. While FOM is a good method for distinguishing between two discrete analyte levels, it gives no information about the shape of the curve. The best approach is often one that uses an analysis which mimics the chemistry of the particular assay. For immunoassays this is often a four parameter fit equation. The test for any fitted equation and algorithm is the use of random samples with various analyte concentrations and the calculation of the error (% CV) and bias. The goal is to seek the lowest % CV with minimal bias throughout the expected range of the assay. A comparison of the DPD results 0-250 nM/mM in urine for two types of analyses is shown in Tables 2 and 3 for the three band immunostrips used in this illustration.

**TABLE 2****Algor1 Results**

Expected Value	DPD	SD	%CV	Bias	DPD/Cr	SD	%CV
0	2.8	2.8		2.8	0.64		
10	13.2	2.4	18.2	3.2	2.82	0.61	21.6
25	28.1	5.0	17.8	3.1	4.06	1.06	26.1
50	49.2	4.8	9.8	-0.8	5.69	0.5	8.8
75	75.5	9.25	12.3	0.5	6.11	0.7	11.5
150	164.2	25	15.2	14.2	9.77	1.36	13.9
250	227	23.6	10.4	-23	8.41	0.89	10.6

**TABLE 3****Total /P1 Results**

Expected Value	DPD	SD	%CV	Bias	DPD/Cr	SD	%CV
0	0.7	2.47		0.723	0.03		
10	10.7	2.34	22.0	0.663	2.2	0.56	25.5
25	27.4	5.51	20.1	2.383	3.93	1.18	30.0
50	51.6	4.59	8.9	1.598	5.78	0.49	8.5
75	80.3	9.99	12.4	5.33	6.29	0.905	14.4
150	158.8	15.9	10	8.807	8.98	1.05	11.7
250	205.6	31.1	15.1	-44	7.38	1.22	16.6

[0019] From the data of Tables 2 and 3, it can be determined that for this particular analysis, the first algorithm has less error, as measured by the % CV, at all DPD values. This example illustrates the somewhat empirical method for finding a correct algorithm. The chosen algorithm will be one which has the lowest error associated with it for a given strip formulation and format and a given clinical range for the analyte.

[0020] After the value for the target analyte has been obtained, the instrument uses the reflectance value at one or more wavelengths of the reagent pad for the second analyte to determine the concentration of this analyte in the fluid test sample. In the case in which DPD is the target analyte and creatinine is the second analyte, the precision (or the reduction of signal to noise) is critical to the assay for both analytes. Absent a high level of precision, the resulting error will produce a test which has little medical significance since as little as a two fold increase in the DPD/creatinine ratio occurs between the normal and osteoporosis states. The second analyte is selected from those materials in the body fluid which are clinically related to the first analyte. The most notable example of a second analyte is creatinine, the end metabolite when creatine becomes creatine phosphate which is used as an energy source for muscle contraction. The creatinine produced is filtered by the kidney glomeruli and then excreted into the urine without reabsorption. In order to increase the sensitivity of urinary assays and minimize the problem of high urine flow rates which result in urine dilution, analyte/creatinine ratios are used in urine protein assays to normalize the urine concentration. Common creatinine assays include the alkaline Jaffe and Benedict-Behre methods which are run at a high pH, typically in the range of from 11.5 to 12.5. More recently, there has been developed a creatinine assay in which the urine sample is contacted with cupric ions in the presence of citrate, a hydroperoxide and an oxidizable dye which provides a colored response in the presence of oxygen free radicals and a pseudoperoxide. This method is more fully described in U.S. Patent 5,374,561. Creatinine quantitation may also be accomplished immunologically as described in WO-96/34271. Those second analytes whose concentration in the body fluid sample is clinically related to the concentration of the target analyte are not limited to creatinine in urine nor is urine the only body fluid which can be assayed by the method of the present inven-

tion. Thus, for example, the body fluid tested can be whole blood, the first (target) analyte can be HbA<sub>1c</sub> and the second analyte can be total hemoglobin since the apparent concentration of HbA<sub>1c</sub> can be adjusted to the whole blood's total hemoglobin concentration to factor out bias in the HbA<sub>1c</sub> assay. Inulin, administered intravenously, is, like creatinine, an indicator of renal flow. In serology based assays the first analyte can be total prostate specific antigen and the second analyte free prostate specific antigen. Another pair of analytes whose concentrations are clinically related are alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) which are widely distributed in human tissues. Both AST and ALT are normally present in human plasma, bile and saliva. With viral hepatitis and other forms of liver disease, levels of AST and ALT are elevated even before clinical signs of disease, such as jaundice, appear. In toxic or viral hepatitis, ALT is characteristically as high or higher than the ALT and the ALT/AST ratio, which is normally <1, approaches or becomes greater than unity. Furthermore, AST concentrations increase after myocardial infarction thereby changing the ratio of these two enzymes and their activity. Thus, clinically significant results can be obtained by determining the ratio of these two analytes in serum.

[0021] Many clinically significant target analytes are present in urine and are determinable by means of the present invention. Among these analytes are deoxypyridinoline (DPD), human serum albumin, drugs of abuse such as amphetamines/barbiturates/cocaine, clinically important protein markers such as prostate specific antigen, kidney disease proteins such as lactate dehydrogenase, N-acetyl-B-D-glucosaminidase, pregnancy or fertility associated hormones such as human chorionic gonadotropin, follicle-stimulating hormone and lutenizing hormone, markers of urinary tract infection such as Tamm-Horsfall protein or lipopolysaccharide, beta-2-microglobulin, amylase and chlamydial LPS. Determining the ratio of IgA/IgG to assess infection can be accomplished by means of the present invention. Correcting their absolute concentrations for variations in renal flow by ratioing these concentrations to observed creatinine concentrations increases the precision and accuracy of the measurements.

[0022] While the means for detecting the signal from the developed strip will depend on the detectable label attached to the labeled binding partner, the use of a reflectance meter is typical when the label's detectable physical property is the reflectance of light at a predetermined wavelength in the visible or infrared region of the spectrum. In a preferred embodiment, there is provided a reflectance meter with means for moving the strip or the meter's detector element relative to each other such as by use of a specimen table for the strip which can be moved laterally under the readhead of the detector. This technique will assist in providing accurate quantitation for regions of the strip which may not have been precisely located with respect to the detection means of the reflectance meter. More specifically, the location of the strip relative to the detector can be under microprocessor control, so that the reflectance from the second, third or fourth regions of the strip, and individual bands within these regions, can be individually determined.

[0023] The method of practicing the present invention is more fully illustrated by the following examples:

#### Example 1

[0024] A test strip for the determination of creatinine and deoxypyridinoline (DPD) containing six distinct areas assembled together onto a polystyrene backing of 4 inches (101.6 mm) in length and 0.2 inch (5.0 mm) in width is illustrated by Fig. 1. Referring to Fig. 1, area 1 is the creatinine pad with a size of 0.2 x 0.2 inch. The creatinine pad was prepared as follows to render it suitable for the colorimetric determination of creatinine: Whatman 3 mm filter paper was first treated by dipping it to a depth of 0.2 inch into a solution containing 30 mM copper sulfate, 50 mM citrate, 750 mM glycerol-2-phosphate, 0.2% hexane sulfonic acid, 50 mM phytic acid and 0.2% sodium dodecyl sulfonate (SDS) at pH 6.94. After drying, the strip was dipped into a solution containing 33 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 73 mM diisopropylbenzene dihydroperoxide, 63 mM triisopropanolamine borate, 0.5% plasonde and 0.032% ethyl orange. The intensity of the colored response produced when the strip is contacted with an aqueous medium containing creatinine is proportionate to the concentration of creatinine. Area 2 is the buffer pad, prepared by impregnation of Whatman F075-07 glass fiber with 0.5 to 1 M glycine and 175 to 350 mM urea and having a size of 0.2 x 0.5 inch (12.7 mm). The buffer pad serves the purpose of buffering the pH of urine samples to the desired value. For example, the pH of urine can range from 4.5 to 8 and a buffer pad can be used to keep the samples at a pH >7 to favor the antigen/antibody bonding reaction. There is a 0.1 inch (2.5 mm) gap between creatinine pad 1 and buffer pad 2 for purposes of isolating the creatinine reagent from the buffer pad reagent. Area 3 is a gold sol-DPD antibody pad (first region containing a labeled binding partner specific for the analyte). Areas 4 and 5 are the immunochromatography development area where the capture and detection reagents are deposited onto one piece of nitrocellulose having a size of 0.2 x 1.25 inch (31.75 mm). Area 4 contains three capture bands (second region containing immobilized analyte) with DPD immobilized to carboxyl terminated polyethylene glycol with a band width of about 0.059 inch (1.5 mm) per band and a 0.2 inch space between the bands (from center to center). At 0.2 inch from the center of the third capture band is area 5 consisting of one anti-IgG collection band (third region for immobilizing unreacted labeled binding partner) with a band width of about 0.059 inch (1.5 mm). At 0.2 inch above the collection band is the absorbant pad 6 which serves to absorb the liquid which migrates from the nitrocellulose area of the strip having a size of 0.2 inch x 0.5 inch (12.7 mm).

[0025] To perform the assay, the strip was dipped into the test solution, i.e. a urine sample containing the DPD analyte

to be determined, for 3 seconds to a depth such that only the creatinine zone and buffer pad were below the surface of the test solution which allowed the test solution to flow up the strip by capillarity through the capture bands of the capture region, the single band of the detection region and to the absorbant pad. At the end of the 3 second dip the strip was placed on the read table of a CLINITEK® 50 reflectance spectrometer and the device's start button pressed. The creatinine pad reflectance was recorded at 3 minutes and the reflectance of the immuno DPD strip (all 4 bands) was measured and recorded at 3 minutes. Reflectance signals for the DPD assay were measured with IR and green filters whereas reflectance for the creatinine assay was measured using red and green filters. The device gives a response in decode values which is derived by equations 1 to 5.

#### Equation 1

$$\text{Decode for Creatinine} = \frac{[R]_{\text{green}}}{[R]_{\text{red}}}$$

where  $[R]_{\text{green}}$  is the reflectance measured with the green filter,  $[R]_{\text{red}}$  is the reflectance measured with the red filter.  
[0026] For the DPD assay, the band response signals were designated as indicated in Table 4.

**TABLE 4**

Band Signals Designation for DPD Assay

<u>Band #</u>	<u>Type</u>	<u>Designation</u>
1	Capture band 1	P1
2	Capture band 2	P2
3	Capture band 3	P3
4	Collection band 1	P4

The reflectance with the green filter is ratioed to the reflectance with the IR filter to reduce the error from the variations between strips such as height and surface variations. The reflectance at the IR wave-length remains fairly constant regardless of the gold sol intensity of the band. The corrected reflectance,  $[Rn]$ , is calculated according to Equation 2.

#### Equation 2

$$[Rn] = \frac{[Rn]_{\text{green}} \times 65}{[Rn]_{\text{IR}}}$$

where n is the band number 1, 2, 3 or 4,  $[Rn]_{\text{green}}$  is the reflectance of band n with green filter,  $[Rn]_{\text{IR}}$  is the reflectance of band n with IR filter. The number 65 is the assigned corrected reference value since the % reflectance with the IR filter is about 65%.

[0027] The IR corrected reflectance value,  $[Rn]$ , is then converted to K/S according to Equation 3 to give the band response signal for each band:



## Equation 3

$$\text{Band Signal} = P_n = \frac{(1 - [R_n])^2}{2 \times [R_n]}$$

where band signal,  $P_n$ , is the K/S transformation reflectance value,  $[R_n]$ .

[0028] The response decode of each band is finally computed according to Equation 4.

## Equation 4

$$\text{Decode for DPD assay} = \frac{T}{P_1}$$

where  $T$  is the summation of the band signal for all bands (Equation 5).

## Equation 5

$$T = \sum_{n=1}^N P_n$$

where  $N$  is the total number of capture bands and collection bands which is 4 in the present example,  $P_n$  is the band signal  $n$  and  $n$  is 1, 2, 3 or 4.

[0029] Standard curves for DPD and creatinine were generated using calibrators containing six levels of analyte concentrations. Examples of standard curves are shown in Fig. 2 for the DPD assay and Fig. 3 for the creatinine assay. The DPD and creatinine concentrations for the urine test sample were calculated from the DPD and creatinine standard curves respectively. The DPD/creatinine ratio in nM/mM was then calculated for urine sample A as per the following calculation:

DPD concentration calculated from the DPD standard curve = 123 nM

Creatinine concentration calculated from the creatinine standard curve = 10.2 mM

The DPD/creatinine ratio = 123 nM/10.2 mM = 12.1 nM/mM.

[0030] The cutoff for determination of a state of high bone resorption is a DPD/creatinine ratio is 7.4 nM/mM. Lower than 7.4 is normal and larger than 7.4 is at the state of high bone resorption. Therefore, in this example, the result indicates a state of high bone resorption. A second urine sample was analyzed in a similar manner and gave the following results:

DPD concentration = 123 nM

Creatinine concentration = 20.5 mM

DPD/Creatinine ratio = 6.0 nM/mM.

Although the DPD concentration is the same, the ratio of DPD to creatinine indicates a state of low bone resorption.

[0031] Five runs were made using the above procedure with urine samples containing varying amounts of DPD and creatinine. The expected and observed ratios as well as standard deviations, % coefficient of variance and positive/neg-

ative biases are set out in Table 5. From Table 5 it can be determined that a precision of less than 12% CV was obtained at three levels, 4.52, 7.54 and 12.07 nM/mM of DPD to creatinine.

TABLE 5

**DPD/Creatinine Assay Performance**

Expected DPD/CR nM/mM	Recovered			
	DPD/CR nM/mM	SD	%CV	Bias nM/mM
4.52	4.29	0.50	11.6%	-0.23
7.54	7.59	0.89	11.7%	0.05
12.07	12.04	1.38	11.5%	-0.03

Average %CV = 11.9%

[0032] While the gold sol labeled antibodies are visually observable in the capture and collection zones of the strip, clinically meaningful results are obtainable only through the use of a reflectance meter. This is the case because of the use of multiple bands across the entire length of the strip. In addition, the band signals require reflectance measurement at different wavelengths (IR, green and red) using an instrument with the capability to measure and record the reflectance at these wavelengths. The reflectance measurements are ratioed based on a predetermined algorithm using the instrument's software. Furthermore, the analyte concentrations are determined using standard curves stored in the instrument and the DPD/creatinine ratio is computed using the software set up in the instrument.

[0033] In the above example, the final response signal (decode) for the DPD assay was determined using the algorithm  $\text{decode} = [T/P_n]$  where T is the summation of the signal from all four bands and  $P_n$  is the band signal of band 1. The use of this algorithm enhances the accuracy of the assay because ratioing the band signal minimizes the systematic error such as error introduced by instrument to instrument variation. Other algorithms may be used to determine the final response signal. The response signal in this example was determined as:

$$\text{Response Signal} = [T/\text{Capture Band 1}] \text{ or } [T/P_1]$$

where all band signals are K/S transformation reflectance values and T is the summation of capture bands and detection bands.

[0034] The advantages of using band ratioing is demonstrated by the data of Tables 6 and 7 from which it can be determined that the precision with which the strip can determine the concentration of DPD is much greater than that which is obtainable when using only the signal from the capture zone.

**TABLE 6**Response Signal = Band Ratioing Algorithm [T/P<sub>1</sub>]

Expected	Recovered		
DPD/CR nM/mM	DPD/CR nM/mM	SD	%CV
4.15	4.23	0.53	12.5
8.09	8.10	0.28	3.5
10.37	10.44	1.16	11.1

**TABLE 7**Response Signal = Capture Zone [P<sub>1</sub>] (no band ratioing)

Expected	Recovered		
DPD/CR nM/mM	DPD/CR nM/mM	SD	%CV
4.15	2.84	4.1	144
8.09	7.74	0.46	6.0
10.37	10.99	2.0	18.5

[0035] Alternatively, the final response signal can be calculated as:

$$\text{Response Signal} = [\text{Detection Band} / \text{Capture Band}]$$

where all band signals are K/S transformation reflectance values. Alternatively, when the strip contains multiple capture bands and detection bands, the final response signal can be calculated as:

$$[\text{Capture Band 1} / \text{Detection Band 1}]$$

where all signals are K/S transformation reflectance values. Another method of calculating the response signal involves using the algorithm:

$$\text{Response Signal} = [W_{\text{cap}} * \text{Capture Band 1} / W_{\text{del}} * \text{Detection Band}]$$

where all band signals are reflectance values and the  $W_{\text{cap}}$  and  $W_{\text{del}}$  are weighting functions which weight the capture bands and detection bands differently. Thus, a large number of algorithms can be used to determine the final response signal.

[0036] The calculation of the response signal by ratioing the signals from the labeled binding partner immobilized in the second (capture) region of the strip and the labeled binding partner immobilized in the third (detection) region is critical to increasing the precision of the assay by reducing the signal to noise ratio. This enhanced precision is necessary for the test to have clinical significance since only a two-fold increase in the DPD/creatinine ratio occurs between the normal and disease indicating osteoporosis states.

[0037] Further evidence of the improvement in analytical results that can be achieved by the present invention is presented in Tables 8-10. These table were prepared using the same data set but 3 different algorithms ([T/P<sub>1</sub>] with band

ratioing, % reflectance of first capture band with no IR correction and no band ratioing and % reflectance of first capture band with no band ratioing but with IR correction) are compared.

**TABLE 8**

Performance Using [T/P<sub>1</sub>] Band Ratioing Algorithm

Expected DPD, mM	Recovered DPD, mM						Expected ratio	DPD/CR, mM/mM					
	mean	sd	%CV	Bias	%Bias			mean	sd	%CV	Bias	%Bias	
11	12.3	2.0	16.13	1.29			4.1	4.2	0.7	16.71	0.08	1.97	
33	29.6	2.8	9.44	-3.35	-10.16		1.7	1.4	0.2	13.36	-0.21	-12.71	
72	70.8	4.3	6.11	-0.66	-0.93		8.1	8.1	0.2	2.68	-0.01	-0.17	
110	116.8	2.0	1.74	6.85	6.22		20.7	23.1	0.6	2.77	2.34	11.28	
165	159.9	9.3	5.80	-5.14	-3.12		12.4	12.4	0.9	6.87	-0.05	-0.37	
275	275.8	12.7	4.61	0.78	0.28		10.4	10.6	1.2	10.94	0.22	2.08	
	mean	5.54			-1.54			mean	7.32			0.35	

note: the first level was excluded in the mean calculation

TABLE 9

Performance Using %R of Capture Band 1  
With No Band Ratioing and No IR Correction

Expected DPD, nM	Recovered DPD, nM						Expected ratio	DPD/CR, nM/nM					
	mean	sd	%CV	Bias	%Bias			mean	sd	%CV	Bias	%Bias	
11	7.5	10.3	138.26	-3.55			4.1	2.9	4.1	143.86	-1.30	-31.29	
33	38.3	14.9	38.90	5.30	16.06	1.7	1.9	0.8	42.11	0.24	14.52		
72	69.7	4.6	6.60	-1.80	-2.52	8.1	7.9	0.5	6.33	-0.19	-2.33		
110	114.9	10.9	9.49	4.90	4.45	20.7	21.7	2.0	9.22	0.96	4.64		
165	159.1	20.1	12.63	-5.90	-3.58	12.4	12.0	1.3	10.83	-0.44	-3.56		
275	264.3	27.7	10.48	-10.70	-3.89	10.4	10.0	1.6	16.00	-0.37	-3.56		
	mean	15.62			2.11			mean	16.90			-3.60	

note: the first level was excluded in the mean calculation

TABLE 10

Performance Using %R of Capture Band  
With No Band Ratioing But With IR Correction

Expected DPD, nM	Recovered DPD, nM						Expected ratio	DPD/CR, nM/nM					
	mean	sd	%CV	Bias	%Bias			mean	sd	%CV	Bias	%Bias	
11	7.4	10.1	136.49	-3.60			4.1	2.8	4.1	146.43	-1.35	-32.49	
33	38.8	13.4	34.54	5.80	17.58	1.7	2.0	0.7	35.00	0.34	20.55		
72	68.2	1.4	2.05	-3.30	-4.62	8.1	7.7	0.5	6.49	-0.39	-4.80		
110	116.9	7.1	6.07	6.90	6.27	20.7	22.0	1.2	5.45	1.26	6.08		
165	158.2	16.0	10.11	-4.80	-4.12	12.4	11.9	0.9	7.56	-0.54	-4.37		
275	288.8	40.6	14.06	13.80	5.02	10.4	11.0	2.0	18.18	0.63	6.08		
	mean	13.37			4.03			mean	14.54			-1.49	

#### Claims

1. A method for determining the concentration of an analyte in a sample of body fluid which comprises the steps of:

a) providing a test matrix through which the fluid sample can flow by capillarity, said strip having a first region which contains mobile specific binding partner for the analyte which binding partner bears a detectable label and can react with the analyte to form an analyte/labeled binding partner complex, at least one second region which contains immobilized analyte or an immobilized binding partner which is specific for an epitope of the analyte different than that to which the labeled binding partner is specific, at least one third region which contains means for capturing the analyte/labeled specific binding partner complex which is not bound in the second region and a fourth region which contains means for producing a detectable signal the intensity of which corresponds to the level of a second analyte whose concentration is clinically related to that of the first analyte whose concentration is being determined;

b) developing the matrix by applying a sample of a body fluid suspected of containing the first and second ana-

lytes thereto thereby allowing it to contact the labeled specific binding partner so that analyte present in the fluid sample binds to the labeled specific binding partner to form a complex while leaving excess, unreacted labeled binding partner free to further react whereby the fluid sample carries the analyte/labeled binding partner complex and unreacted labeled binding partner along the matrix by capillarity to the second region containing the immobilized analyte in which region unreacted labeled binding partner is bound to the immobilized analyte in inverse relationship to the concentration of the first analyte in the fluid test sample or is bound to the immobilized specific binding partner in a direct relationship to the concentration of analyte in the fluid test sample; and the labeled specific binding partner which did not bind to the second region is carried by capillarity to the third region where it is immobilized by the immobilization means;

c) reading the second region of the developed matrix on an instrument having a detector capable of measuring the signal from the detectable label to determine the concentration of the labeled binding partner in the second zone and reading the third zone of the developed strip in a similar manner to determine the signal from the labeled binding partner in the third zone of the matrix;

d) determining the final response signal by ratioing the signals from the labeled binding partner captured in the second region and the labeled binding partner immobilized in the third region;

e) determining the concentration of the first analyte in the fluid sample by comparing the final response signal determined in step d with final response signals determined in a similar manner for fluid samples containing known concentrations of the first analyte;  
and

f) correcting the concentration of first analyte determined in step e by determining the concentration of the second analyte in the fluid test sample by measuring the intensity of the signal in the fourth region of the strip and then determining the ratio of the second analyte to the first analyte whose quantitative concentration is being sought.

2. The method of Claim 1 wherein the body fluid is urine, whole blood, plasma, serum, sweat or saliva.

3. The method of Claim 2 wherein the body fluid is whole blood, the first analyte is HbA<sub>1c</sub> and the second analyte is total hemoglobin.

4. The method of Claim 2 wherein the body fluid is serum, the first analyte is transferrin and the second analyte is transferrin-iron binding capacity.

5. The method of Claim 2 wherein the body fluid is urine, the first analyte is a urine borne substance and the second analyte is a material whose concentration is a measure of renal clearance.

6. The method of Claim 5 wherein the second analyte is creatinine or inulin.

7. The method of Claim 6 wherein the first analyte is deoxypyridinoline, human serum albumin, amphetamines, barbituates, cocaine, prostate specific antigen, lactate dehydrogenase, N-acetyl-B-D-glucosaminidase, human chorionic gonadotropin, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, Tamm-Horsfall protein, lipopolysaccharide, beta-2-microglobulin, amylase and chlamydial LPS.

8. The method of Claim 2 wherein the body fluid is whole blood or serum, the first analyte is total prostate specific antigen and the second analyte is free prostate specific antigen.

9. The method of Claim 1 wherein the first analyte is alanine aminotransferase and the second analyte is aspartate aminotransferase.

10. The method of Claim 1 wherein the matrix is in the form of a strip through which the fluid sample flows horizontally.

11. The method of claim 1 wherein the second region of the test matrix is divided into 3 discrete bands, the third region is a single band and the final response signal is determined by solving the equation:

$$\text{Response Signal} = [T/P_1]$$

where T is the summation of the signal from all four bands and  $P_1$  is the first band of the second region.

12. The method of Claim 1 wherein the second and third regions of the test matrix are divided into multiple capture and detection bands respectively and the final response signal is determined by solving the equation:

$$\text{Response Signal} = \text{Capture Band 1/Detection Band 1}$$

where capture band 1 is the signal from the first band of the second region and detection band 1 is the signal from the first band of the third region.

13. The method of Claim 1 wherein the strip is read by use of a reflectance meter which is equipped with software which is pre-programmed with the appropriate algorithm for the determination of the final response signal from reflectance signals received from the first and second regions and for the determination of the concentration of the second analyte from the reflectance signal received from the fourth region and for the determination of the ratio of the concentration of the second analyte in the sample of body fluid to the concentration of the first analyte to determine the corrected concentration of the first analyte.

14. A method for the detection of the concentration of an analyte in a sample of body fluid which comprises:

a) applying the body fluid to a multizoned strip having a first zone which contains mobile specific binding partner for the analyte which binding partner bears a visually detectable label and can react with the analyte to form an analyte/labeled specific binding partner complex, at least one second region which contains immobilized analyte or an immobilized binding partner for an epitope of the analyte different than that to which the labeled specific binding partner is specific and at least one third region which contains means for capturing the analyte/labeled specific binding partner complex which is not bound in the second region;

b) determining the amount of labeled specific binding partner captured in the second region(s) by means of a reflectance meter which is able to detect reflectance at a wavelength at which the visible label reflects light and determining the amount of analyte/labeled specific binding partner complex is immobilized in the third region(s) in a similar manner;

c) determining a final response signal by ratioing the reflectance signals from the labeled specific binding partner captured in the second region(s) and the labeled binding partner immobilized in the third region(s) using an algorithm and a number of second and third regions chosen in a manner which provides a final response signal that can be read with enhanced precision by the reflectance meter;

d) determining the concentration of the analyte by comparing the final response signal with final response signals determined in the same manner for body fluid samples containing known concentrations of the analyte.

15. The method of Claim 1 wherein the second region of the strip is divided in to 3 bands, the third region is a single band and the final response signal is determined by solving the equation:

$$\text{Response Signal} = [T/P_1]$$

where T is the summation of the signal from all four bands and  $P_1$  is the first band of the second region.

16. The method of Claim 1 wherein the second and third regions of the test strip are divided into multiple capture and detection bands respectively and the final response signal is determined by solving the equation:

$$\text{Response Signal} = \text{Capture Band 1/Detection Band 1}$$

where capture band 1 is the signal from the first band of the second region and detection band 1 is the signal from the first band of the second region.

17. The method of Claim 14 wherein the strip contains a fourth region which contains means for producing a visually detectable signal, the intensity of which corresponds to the level of a second analyte in the body fluid whose concentration is clinically related to that of the analyte whose concentration is being determined and wherein the final response signal is corrected by determining the ratio of the analyte whose concentration is being sought to the sec-

ond analyte.

18. The method of Claim 1 wherein the body fluid is urine and the analyte is deoxypyridinoline.

5 19. The method of Claim 17 wherein the body fluid is urine, the first analyte is a urine borne substance and the second analyte is a material whose concentration is a measure of renal clearance.

20. The method of Claim 5 wherein the second analyte is creatinine.

10 21. The method of Claim 14 wherein the strip is read by use of a reflectance meter which is equipped with software which is pre-programmed with the appropriate algorithm for the determination of the final response signal from the reflectance signals received from the second and third regions.

15 22. The method of Claim 21 wherein the strip contains a fourth region which contains means for producing a spectrometrically detectable signal, the intensity of which corresponds to the level of a second analyte in the body fluid whose concentration is clinically related to that of the analyte whose concentration is being determined and the reflectance meter is equipped with software which is preprogrammed for the determination of the concentration of the analyte based on the reflection from the fourth region and for the determination of the ratio of the concentration of the second analyte to that of the first analyte as determined from the final response signal to determine the corrected concentration of the first analyte.  
20

25

30

35

40

45

50

55



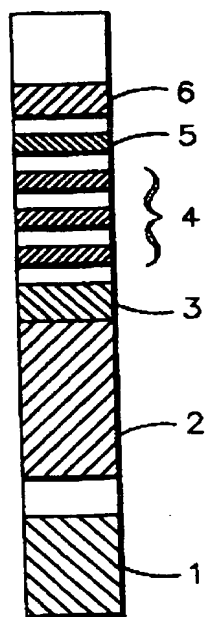


FIG. 1

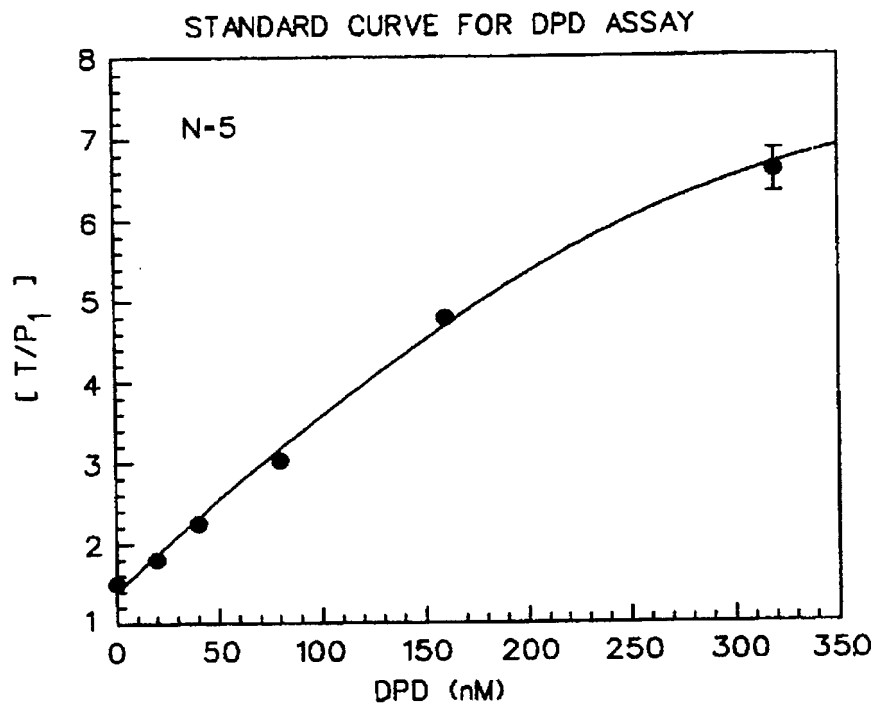


FIG. 2

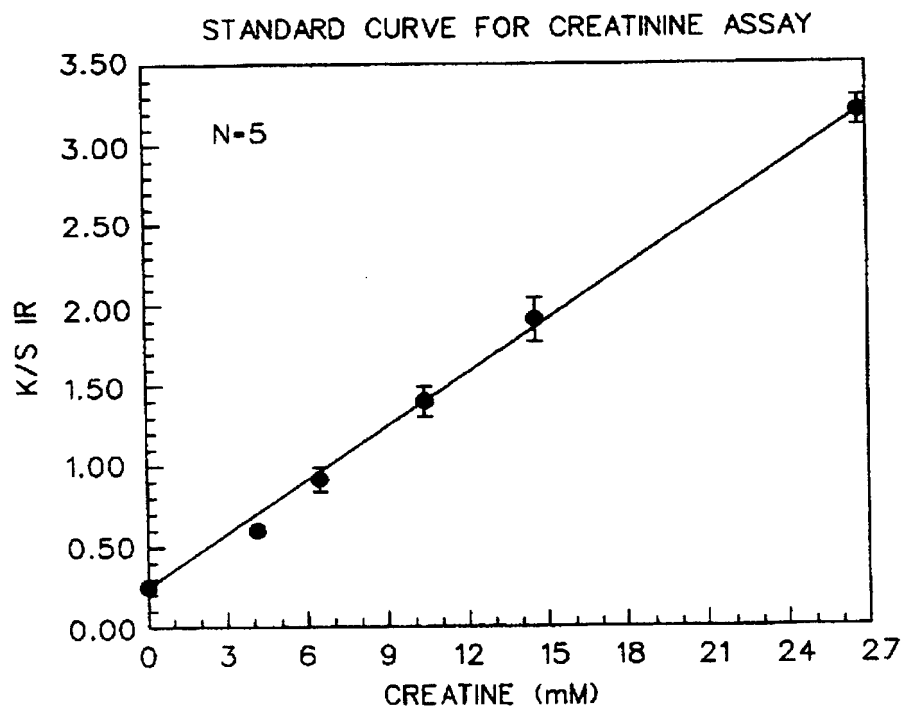


FIG. 3

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-83856

(43)公開日 平成11年(1999) 3月26日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/543

識別記号

5 2 1

F I

G 0 1 N 33/543

5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 14 頁)

(21)出願番号 特願平10-206193

(22)出願日 平成10年(1998) 7月22日

(31)優先権主張番号 0 8 / 9 0 0 5 8 6

(32)優先日 1997年 7月25日

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 391007079

バイエルコーポレーション

アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、

エルクハート、マイルス・アベニュー

1884

(72)発明者 ハイーハン・コー

アメリカ合衆国、インディアナ州、46530、

グレンジャー、サウス・レイクショア・ド

ライブ 15858

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 臨床的に重要な分析対象物比を得るための装置及び方法

(57)【要約】

【課題】 免疫クロマトグラフィー試験片フォーマットの  
使用により達成される分析結果を定量化するための手  
段の提供。

【解決手段】 例えば捕捉バンドと検出バンドでの第一  
の分析対象物に関する反射率値の比と、第一の分析対象  
物と臨床的に関連する第二の分析対象物の反射率値に基  
づき、第一の分析対象物の濃度を決定する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 液体試料中の分析対象物の濃度を測定する方法であって、

a) その中を液体試料が毛管作用により流れることができる試験マトリックスを提供する工程（ここで、該試験マトリックスは、分析対象物に対して特異的である移動性結合パートナー（該結合パートナーは、検出可能な標識を有しており、また、分析対象物と反応して分析対象物／標識化結合パートナー複合体を形成することができる）を含有する第一領域と；固定化分析対象物、又は標識化結合パートナーが特異的であるエпитープとは別の分析対象物のエпитープに対して特異的である固定化結合パートナーを含有する、少なくとも一つの第二領域と；第二領域では結合しない該分析対象物／標識化特異的結合パートナー複合体を捕捉するための手段を含む、少なくとも一つの第三領域と；検出可能な信号（該信号の強度は、第二の分析対象物のレベルに相当し、その第二の分析対象物の濃度は、濃度が測定されるべき第一の分析対象物のそれに臨床的に関連する）を発生するための手段を含む第四領域を有する）；

b) 第一及び第二の分析対象物を含有する疑いがある液体試料を適用することにより、該マトリックスを展開する工程（これにより、標識化特異的結合パートナーをそれに接触させ、そのために、過剰な未反応標識化結合パートナーを更に反応させるために遊離な状態にして、液体試料中に存在する分析対象物が標識化特異的結合パートナーに結合して複合体を形成し、これにより、液体試料は、分析対象物／標識化結合パートナー複合体と未反応の標識化結合パートナーとを、該マトリックスに沿って、毛管作用により、第二領域（この領域において、未反応標識化結合パートナーが、液体試料中の第一の分析対象物の濃度と反比例の関係で、固定化分析対象物に結合するか、分析対象物／標識化結合パートナー複合体が、液体試料中の分析対象物の濃度と比例の関係で、固定化特異的結合パートナーに結合する）に運び、第二領域で結合しなかった標識化結合パートナーは、毛管作用により第三領域に運ばれ、そこで固定化手段により固定化される）；

c) 展開したマトリックスの第二領域を、検出可能な標識からの信号を測定しうる検出器を有する装置により、第二領域中の標識化結合パートナーの濃度を測定するために読み取り、また、展開したマトリックスの第三領域を、同様の方法により、マトリックスの第三領域中の標識化結合パートナーからの信号を測定するために読み取る工程；

d) 第二領域で捕捉された標識化結合パートナーからの信号と第三領域で固定化された標識化結合パートナーからの信号とを比率化することにより、最終応答信号を決定する工程；

e) 液体試料中の第一の分析対象物の濃度を、工程 d)

で決定した最終応答信号と、既知濃度の第一の分析対象物を含有する流体試料について同様の方法で決定した最終応答信号とを比較することにより決定する工程；及び f) マトリックスの第四領域における信号の強度を測定することにより流体試料中の第二の分析対象物の濃度を決定し、その後定量的濃度が求められている第一の分析対象物に対する第二の分析対象物の比を決定することにより、工程 e) で決定した第一の分析対象物の濃度を補正する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】 体液が、尿、全血、血漿、血清、汗又は唾液である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 体液が全血であり、第一の分析対象物が HBA<sub>1c</sub> であり、第二の分析対象物が全ヘモグロビンである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 体液が血清であり、第一の分析対象物がトランスフェリンであり、第二の分析対象物がトランスフェリン-鉄結合能 (transferrin-iron binding capacity) である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】 体液が尿であり、第一の分析対象物が尿中物質であり、第二の分析対象物がその濃度が腎臓クリアランスの尺度である物質である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】 第二の分析対象物がクレアチニン又はイヌリンである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 第一の分析対象物が、デオキシビリジノリン、ヒト血清アルブミン、アンフェタミン類、バルビツエート類、コカイン、前立腺特異性抗原、乳酸デヒドロゲナーゼ、N-アセチル-β-D-グルコサミンダーゼ、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、卵巣刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、タム・ホースフォール蛋白質、リボ多糖、β<sub>2</sub>ミクログロブリン、アミラーゼ又はクラミジアリボ多糖 (chlamydial LPS) である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 体液が全血又は血清であり、第一の分析対象物が全前立腺特異性抗原であり、第二の分析対象物が遊離の前立腺特異性抗原である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 9】 第一の分析対象物がアラニンアミノトランスフェラーゼであり、第二の分析対象物がアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】 マトリックスが試験片の形態であり、その中を液体試料が平面方向に流れる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】 試験マトリックスの第二領域が三個の別個のバンドに分割されており、第三領域が単一バンドであり、最終応答信号が、式：

【数 1】

$$\text{応答信号} = \{T/P_1\}$$

（式中、T は全 4 バンドからの信号の合計であり、P<sub>1</sub>

は第二領域の第一バンドである)を解くことにより決定される、請求項1記載の方法。

【請求項12】 試験マトリックスの第二及び第三領域が、複数の捕捉及び検出バンドにそれぞれ分割されており、最終応答信号が、式：

【数2】

$$\text{応答信号} = \text{捕捉バンド 1} / \text{検出バンド 1}$$

(式中、「捕捉バンド1」は第二領域の第一バンドからの信号であり、「検出バンド1」は第三領域の第一バンドからの信号である)を解くことにより決定される、請求項1記載の方法。

【請求項13】 第二及び第三領域から受け取った反射率信号から最終応答信号を決定するための、また、第四領域から受け取った反射率信号から第二の分析対象物の濃度を決定するための、また、第一の分析対象物の補正濃度を決定するために、第一の分析対象物濃度に対する体液試料中の第二の分析対象物濃度の比を決定するための、適当なアルゴリズムで予めプログラム化されているソフトウェアを備えた反射率計の使用により試験片を読み取る、請求項1記載の方法。

【請求項14】 体液試料中の分析対象物の濃度を測定する方法であって、a) 体液試料をマルチ領域試験片に適用する工程(ここで、該試験片は、分析対象物に対して特異的である移動性結合パートナー(該結合パートナーは、視覚的に検出可能な標識を有しており、また、分析対象物と反応して分析対象物/標識化結合パートナー複合体を形成することができる)を含有する第一領域と；固定化分析対象物、又は標識化結合パートナーが特異的であるエпитープとは別の分析対象物のエпитープに対して特異的である固定化結合パートナーを含有する、少なくとも一つの第二領域と；第二領域では結合しない該分析対象物/標識化特異的結合パートナー複合体を捕捉するための手段を含む、少なくとも一つの第三領域を含む)；

b) 第二領域(一つ又は複数)で捕捉された標識化特異的結合パートナーの量を、可視標識が反射する光の波長で反射率を検出することができる反射率計により決定し、また、第三領域(一つ又は複数)で固定化された分析対象物/標識化特異的結合パートナー複合体の量を、同様の方法により決定する工程；

c) 反射率計により高められた精度で読み取られうる最終応答信号を提供するように選択された複数の第二及び第三領域とアルゴリズムを用いて、第二領域(一つ又は複数)で捕捉された標識化特異的結合パートナーからの反射率信号と第三領域(一つ又は複数)で固定化された標識化結合パートナーからの反射率信号とを比率化することにより、最終応答信号を決定する工程；

d) 該最終応答信号と、既知濃度の分析対象物を含有する体液試料に関して同様の方法で測定された最終応答信号とを比較することにより、分析対象物の濃度を決定す

る工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項15】 試験片の第二領域が三個のバンドに分割されており、第三領域が単一バンドであり、最終応答信号が、式：

【数3】

$$\text{応答信号} = [T/P_1]$$

(式中、Tは全4バンドからの信号の合計であり、P<sub>1</sub>は第二領域の第一バンドである)を解くことにより決定される、請求項1記載の方法。

【請求項16】 試験片の第二及び第三領域が、複数の捕捉及び検出バンドにそれぞれ分割されており、最終応答信号が、式：

【数4】

$$\text{応答信号} = \text{捕捉バンド 1} / \text{検出バンド 1}$$

(式中、「捕捉バンド1」は第二領域の第一バンドからの信号であり、「検出バンド1」は第三領域の第一バンドからの信号である)を解くことにより決定される、請求項1記載の方法。

【請求項17】 試験片が、視覚的に検出可能な信号(ここで、該信号の強度は、体液中の第二の分析対象物のレベルに相当し、その第二の分析対象物の濃度は、濃度が測定されるべき分析対象物のそれに臨床的に関連する)を発生するための手段を含む第四領域を有し、また、第二の分析対象物に対する、濃度が求められている分析対象物の比を決定することにより最終応答信号を補正する、請求項14記載の方法。

【請求項18】 体液が尿であり、分析対象物がデオキシビリジノリンである、請求項1記載の方法。

【請求項19】 体液が尿であり、第一の分析対象物が尿中物質であり、第二の分析対象物がその濃度が腎臓クリアランスの尺度である物質である、請求項17記載の方法。

【請求項20】 第二の分析対象物がクレアチニンである、請求項5記載の方法。

【請求項21】 第二及び第三領域から受け取った反射率信号から最終応答信号を決定するための適当なアルゴリズムで予めプログラム化されているソフトウェアを備えた反射率計の使用により試験片を読み取る、請求項14記載の方法。

【請求項22】 試験片が分光光度的に検出可能な信号(ここで、該信号の強度は、体液中の第二の分析対象物のレベルに相当し、その第二の分析対象物の濃度は、濃度が測定されるべき分析対象物のそれに臨床的に関連する)を発生するための手段を含む第四領域を有し、反射率計は、第四領域からの反射率に基づき分析対象物の濃度を決定するための、また、第一の分析対象物の補正濃度を決定するために、最終応答信号から決定された第一の分析対象物の濃度に対する第二の分析対象物のその比を決定するための、予めプログラム化されているソフトウェアを備えている、請求項21記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来の技術】免疫クロマトグラフィー試験片フォーマットは、目視検出系を用いる定量及び半定量アッセイにとり益々一般的になっている。この種の免疫アッセイは、検出が求められている分析対象物を含有する疑いがある液体試料を、免疫クロマトグラフィー試験片の適用ゾーンに適用する工程を含む。この試験片はマトリックス材料からなり、その中を、試験流体及びその中に懸濁又は溶解した分析対象物が、毛管作用により、適用ゾーンから捕捉ゾーン（このゾーンにおいて、検出可能な信号又はその欠如が、分析対象物の存在を示す）へと流れることができる。一般的に、試験片は、検出が求められている分析対象物を、検出可能な標識を有するその特異的結合パートナーに免疫特異的に結合させるための手段を含む。米国特許第4,446,232号明細書に開示されたような一つの系において、試験片は、分析対象物に対する酵素標識・移動性結合パートナーを、試料適用ゾーンの下流にあるゾーンに含有する。分析対象物が試料中に存在する場合、分析対象物はその標識化結合パートナーと結合して複合体を形成し、この複合体は試験片に沿って検出ゾーン（ここで、この検出ゾーンは、その酵素標識の存在下で色応答を提供しうる、その酵素標識に対する基質を含有する）へ流れる。この試験片は、分析対象物が固定化されているゾーンを含むことができ、これにより、試料中の分析対象物の不在のため分析対象物と結合しない標識化結合パートナーが捕捉され、そのために検出ゾーンに達するのを抑制する。この技術については様々な変更が発表されており、それらのすべてはいくつかの競合的特異的結合系を含み、その系において、試料中の分析対象物の存在又は不在が、捕捉ゾーンにおける標識化結合パートナーの検出又は欠如により決定される。

【0002】遊離の標識化抗体を検出する上記免疫測定アッセイの代替手段は、サンドイッチフォーマットと称されるものであり、このフォーマットにおいて、捕捉ゾーンは、標識化抗体が特異的であるエпитープとは別の分析対象物のエпитープに対する固定化抗体を含有する。このフォーマットにおいて、固定化抗体と標識化抗体との間に分析対象物のサンドイッチが形成される。そのために、このフォーマットは、結合した標識化抗体種を検出する免疫測定アッセイである。

【0003】免疫クロマトグラフィーに関するすべての系が、分析対象物の検出に関する信号を提供するために、酵素標識化結合パートナー／酵素基質に依存しているわけではない。米国特許第4,806,311号明細書において、分析対象物と固定化結合パートナーとの特異的結合アッセイ測定（したがって、試薬ゾーンから捕捉ゾーンに移動する標識化試薬を受け取るための捕捉ゾーンと共に）のためのマルチゾーン試験具が開示されて

いる。捕捉ゾーンは、標識化試薬に対する固定化物質を固定形態で含有する。標識化試薬は、検出可能な物理特性を有する化学基を有し、自身の物理特性を基礎として検出可能である。それにより、別の物質との化学反応を要しない。そのような群の例は、蛍光群の有色種、燐光分子、放射性同位体及び電氣的活性部分である。

【0004】米国特許第4,703,017号明細書には、レセプターとして目視可能な粒子状標識の使用が記載されている。金ゾル粒子及び目視可能な染料を含有するリボソームのような様々な粒子状標識について言及されている。

【0005】国際公開第96/34271号パンフレットには、流体試料中の標的分析対象物とクレアチニンを測定するための試験具が開示されている。この試験具は、クレアチニン検出のためのアッセイ試験片と、標的分析対象物検出のための第二のアッセイ試験片とを有する。クレアチニン濃度は、比色法又は標識化クレアチニン結合パートナーの特異的捕捉により測定される。標的分析対象物の濃度は、試料のクレアチニン濃度に基づき補正される。この補正は、マニュアルか、適当にプログラム化された反射率アナライザーのいずれかによりなされる。

【0006】欧州特許出願公開第0462376

(A<sub>2</sub>)号明細書には、免疫クロマトグラフィー手順が開示されている。この手順において、試験片の捕捉部位及び結合体回収部位における信号を検出し、結合体回収部位での信号に対する捕捉部位での信号強度により分析対象物濃度を決定する。これについては、米国特許第5,569,608号明細書もまた関連する。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】免疫クロマトグラフィー試験片フォーマットは、様々な分析対象物（抗原、抗体のいずれであろうと）を測定するための目視可能な系を提供するが、いくつかの分析対象物に関してより正確な定量的結果が要求される場合に、せいぜい半定量的な結果しかもたらないという限界がある。したがって、免疫クロマトグラフィー試験片フォーマットの使用により達成される分析結果を定量化するための手段を提供することが望ましく、これが本発明の目的である。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、体液試料中の分析対象物を測定する方法であって、

a) その中を液体試料が毛管作用により流れることができるマトリックスを含む試験片を提供する工程（ここで、該試験片は、分析対象物に対して特異的である移動性結合パートナー（該結合パートナーは、検出可能な標識を有しており、また、分析対象物と反応して分析対象物／標識化結合パートナー複合体を形成することができる）を含有する第一領域と；固定化分析対象物、又は標識化結合パートナーが特異的であるエпитープとは別の

分析対象物のエпитープに対して特異的である固定化結合パートナーを含有する、少なくとも一つの第二領域と；第二領域では結合しない該分析対象物／標識化特異的結合パートナー複合体を捕捉するための手段を含む、少なくとも一つの第三領域と；検出可能な信号（ここで、この信号の強度は、第二の分析対象物のレベルに相当し、その第二の分析対象物の濃度は、体液中のその濃度が測定されるべき分析対象物の濃度に、臨床的に関連する）を発生するための手段を含む第四領域を有する）；

b) 第一及び第二の分析対象物を含有する疑いがある液体試料を適用することにより、該マトリックスを展開する工程（これにより、標識化特異的結合パートナーをそれに接触させ、そのために、過剰な未反応標識化結合パートナーを更に反応させるために遊離な状態にしなから、液体試料中に存在する分析対象物が標識化特異的結合パートナーに結合して複合体を形成し、これにより、液体試料は、分析対象物／標識化パートナー複合体と未反応の標識化結合パートナーとを、マトリックスに沿って、毛管作用により、第二領域（この領域において、未反応標識化結合パートナーが、液体試料中の第一の分析対象物の濃度と反比例の関係で、固定化分析対象物に結合するか、分析対象物／標識化結合パートナー複合体が、液体試料中の分析対象物の濃度と比例の関係で、固定化特異的結合パートナーに結合する）に運び、第二領域で結合しなかった標識化特異的結合パートナーは、毛管作用により第三領域に運ばれ、そこで捕捉手段により捕捉される）；

c) 展開したマトリックスの第二領域を、検出可能な標識からの信号を測定しうる検出器を有する装置により、第二領域中の標識化結合パートナーの濃度を測定するために読み取り、また、展開したマトリックスの第三領域を、同様の方法により、マトリックスの第三領域中の標識化結合パートナーからの信号を測定するために読み取る工程；

d) 第二領域で固定化された標識化結合パートナーからの信号と第三領域で捕捉された標識化結合パートナーからの信号とを比率化することにより、最終応答信号を決定する工程；

e) 液体試料中の第一の分析対象物の濃度を、工程 d) で決定した最終応答信号と、既知濃度の第一の分析対象物を含有する液体試料について同様の方法で決定した最終応答信号とを比較することにより決定する工程；及び

f) マトリックスの第四領域における信号の強度を測定し、これを第二の分析対象物の濃度値に変換することにより液体試料中の第二の分析対象物の濃度を決定し、その後定量的濃度が求められている第一の分析対象物に対する第二の分析対象物の比を決定することにより、工程 e) で決定した第一の分析対象物の濃度を補正する工程を含むことを特徴とする方法に関する。

【0009】

【発明の実施の態様】本発明は、最初に、その中を流体試料が毛管作用により流れることができる試験マトリックスを提供する工程により実施される。一般に、このマトリックスは、試験片の形態であり、その中を試験流体は平面方向に流れる。試験流体がその中を頂部から底部に又はその逆に鉛直的に流れる層状フォーマットの形態でマトリックスを組み立てるが、以下では好ましい試験片フォーマットに絞る。

10 【0010】試験片は、試験流体及びその中に含まれる分析対象物が毛管作用によりその中を流れることができるすべてのマトリックス材料から製造しうる。また、非吸収性側方流動をサポートすることができる材料のものでありうる。このタイプの流れは、液体流として米国特許第4,943,522号明細書に記載されており、液体の溶解又は分散成分のすべてが、マトリックス材料が一種以上の成分を吸収しうる場合のように一種以上の成分を優先的に保持する場合とは対照的に、マトリックスの中を実質的に等速かつ相対的に弱められない（unimpair-  
20 ed）流れて運ばれる。そのようなマトリックス材料の例は、Porex Technologies製の高密度又は超高分子量ポリエチレンシート材料である。同じく、紙、ニトロセルロース及びナイロンのような吸収性材料がマトリックスとして使用するのに適しており、これからクロマトグラフィー試験片が製造されうる。

【0011】様々な免疫クロマトグラフィー試験片フォーマットが、本発明との関連で使用するのに適する。特に適したフォーマットは、米国特許第4,446,232号明細書に開示されているものであり、抗原の存在を測定するための試験具（この試験具は、固定化分析対象物と、測定が求められる分析対象物に対して特異的である酵素結合抗体とを備えた第一ゾーンを有するマトリックス材料の試験片を有する）がこの中に記載されている。標識化抗体は、試料を介して第一ゾーンに導入された分析対象物と反応した場合、第二ゾーンに流れることができる。しかし、標識化抗体は、試験流体中に分析対象物が不在の場合には、固定化分析対象物との相互作用により第一領域に結合するために、流れないであろう。分析対象物は一般には抗原であるが、分析対象物として  
40 抗体の存在を検出するためにフォーマットを設計しうる。このフォーマットの変形が、米国特許第4,868,108号明細書に開示されている。別の変形では、酵素基質は、第二の固定化抗体の領域に配置されている。これにより、酵素標識化結合パートナーと分析対象物との間で形成された複合体を捕らえることができる。本発明を酵素とその基質の相互作用に限定させる必要はないので、検出可能な信号を提供するためにいかなる物理的に検出可能な信号発生物質を使用してもよいが、この種のフォーマットは本発明への適合に特に適している。  
50 このように、分析対象物に対する標識化結合パートナー

が捕捉されるゾーンから試験片の下流に位置する別個の検出ゾーンにおいて、結合体を固定することにより、物理的に検出可能なその標識の特性がその濃度を決定するために測定されうる二個の領域が提供される。マトリックスの第二領域（時々、捕捉ゾーンという）における検出可能な標識からの信号と、第三領域（時々、検出ゾーンという）における標識の物理的に検出可能な特性からの信号を測定し、ここで、標識化結合パートナー（例えば、標識化結合パートナーが抗体である場合、抗マウス IgG）に対する固定化抗体が捕捉手段である、これらの信号の比を決定することにより、分析対象物濃度に関する試験の精度を上げることができる。この技術によれば、標識化結合体沈着及び／又はマトリックス中の不均一流の不正確さを補正するので精度は上がる。特に、前述の標識化結合体沈着及び不均一流の不正確さは通常は小さいが有意の大きさであるので、それらは結合平衡を実質的に乱さない。したがって、二個の結合領域における信号の比は、いずれかの領域からの信号単独よりも、分析対象物濃度のより正確な測定手段である。この原理は、前述のサンドイッチフォーマットを用いる場合、等しい効力で当てはまる。

【0012】本発明で使用されるマトリックスの第二及び第三領域は、それぞれ2個又は3個のバンドに分割されていてもよく、好ましくは、第二領域は1～3個の別個のバンドを有し、第三領域は1～2個のバンドを有する。これらの領域を複数のバンドに分割することにより、検出された標識化結合パートナー数に対する反射率の非直線性のため、ダイナミックレンジ及び／又はアッセイの精度が上がる。検出された標識化結合パートナーのわずかな変化の測定は、反射率の低い値より高い値においてより確実なので、これら領域を別個のバンドに分割することは望ましい。望ましい捕捉及び／又は捕集バンドの数は、試験片が設計されている個々のアッセイに依存する。捕捉及び補正ゾーンを2個以上の別個のゾーンに分割することは、あるアッセイではダイナミックレンジを上昇させるが、他のアッセイでは上昇させないからである。あるゾーン中の1個を超える単一の捕捉又は検出バンドに着目するならば、ダイナミックレンジは、全体の信号を上昇させようという事実を指す。このように、検出可能な標識が反射率計により検出可能である場合、反射率のかかなりの非直線性及び使用した反射率計に関連した誤差が存する可能性がある。例えば、反射率が70%と75%との相違は相当少量の検出標識を示すのに対し、30%と35%の相違は高いパーセンテージの検出標識を示す。ある種の反射率計を使用する場合、反射率読み取りにおける誤差は一定のままか、反射率値が減少するにつれて増加する。このように、1個以上の付加的な捕捉又は検出バンドを使用することは、粒子濃度に対してより感度のある高い値に反射率読み取りを置く場合、有利である。広いダイナミックレンジが要求され

ないこれらアッセイにおいて、単純な読み取りと、単一の捕捉領域と単一の検出領域とを比率化することは、良好な定量的結果を与えうる。これは以下の実施例1によって例示される。この実施例においては、デオキシビリジノリンが第一の分析対象物であり、捕捉ゾーンは3個のバンド（ $P_1$ 、 $P_2$ 及び $P_3$ ）に分割されており、検出ゾーンは1個のバンド（ $P_4$ ）であり、DPDアッセイのデコードアルゴリズムは $T/P$ 。（ここで、 $T$ は、4個すべてのバンドからの信号の合計である）である。これら試薬バンド反射率値を用いるアルゴリズムは、SN比を最大にし、これにより変動係数（CV）を下げることにによりアッセイの定量性を高めるように構築される。選択されたある特定のアルゴリズムは、使用されるある特定の試験片における試薬バンドの数と、アッセイの感度及び／又は精度とに依存する。適切なアルゴリズムが選択される場合、アルゴリズム値と分析対象物濃度との関係を決定し、非直線回帰関数に当てはめる。そのような当てはめの目的は、選択されたアルゴリズム値を分析対象物濃度のそれに関連づける誤差を減少させることである。回帰関数は、決定されたアルゴリズム値を分析対象物濃度のそれに関連づけるために用いられる校正曲線を決定するために使用される。この関係が確立されたとき、反射率装置中で式として保存されうる校正曲線は、分析対象物濃度を計算するために用いられる。

【0013】捕捉及び検出ゾーンの反射率は互いに対して変化する（すなわち、捕捉ゾーンからの信号が大きくなるにつれ、検出ゾーンからの信号が小さくなる）ので、マルチ捕捉及び／又は検出バンドの使用は、反射率値のこの範囲を改めるように設計される。分析対象物濃度がバンドの反射率を変化させるメカニズムは、ある特定のアッセイの化学作用である。サンドイッチアッセイに関しては、分析対象物濃度の上昇につれ、捕捉バンド反射率は増加し、検出バンド反射率は減少する。競合的アッセイに関しては、流体試料中の分析対象物量が増加するにつれ、捕捉バンド反射率は減少し、検出バンド反射率は増大する。

【0014】付加的な捕捉及び／又は検出バンドの必要性は、付加的バンドにおける変化量が、他のどのバンドより、与えられた分析対象物領域において、かなり大きいかに依存する。標識（すなわち、金ゾル）濃度に依存して、付加的捕捉バンドは検出ゾーンにおける信号変化量も引き下げるであろう。ある種のアッセイにおいて、第二の捕捉バンドは単に第一の捕捉バンドを反映するが、信号変化量が引き下げられ、このような場合、その必要性が疑われる。しかしながら、低反射率のために検出ゾーンが非常に暗いアッセイにおいては、捕捉バンドの付加はこのゾーンにおける信号を引き下げうる。

【0015】概括すると、本発明の本質は、ある特定のアルゴリズムと、付加的な捕捉及び／又は検出バンドを選択し、反射率計によってより大きな精度で読み取るこ



とができるように信号を変える工程を含む。

【0016】適当なアルゴリズムを開発することに関連した二つのステップがある。第一は、できる限り高いレベルにSN比を上昇させることである。第二は、いかなる分析対象物濃度に対しても正確な値を得ることができるように、式に容易に当てはまるアルゴリズムを定めることである。このことを、3個のバンドを含む試験片

(2個の捕捉バンド及び1個の検出バンド)に関連した以下の検討で示す。2個の捕捉バンドは、異なった捕捉試薬濃度を有しており、第一の捕捉バンドは、第二の捕捉バンドより10倍低い捕捉試薬濃度を有する。捕捉及び捕集バンドの様々な組み合わせと濃度を、各アッセイのユニークな特性に依存して用いることができることを\*

表 1

	反射率変化量(%)				FOM		
	捕捉1	捕集1	捕捉1	検出1	捕捉1/ 検出1	75~95% A1	全/捕捉1
0~10	3.6	6.1	1.1	1.39	1.56	1.94	2.07
10~25	4.6	5.9	1.21	1.51	2.51	2.06	2.12
25~50	4.9	5	1.36	1.39	2.18	2.22	2.39
50~75	5.1	2	1.5	0.48	1.98	1.99	1.94
75~150	7.1	3.6	2.37	0.84	2.07	3.05	2.91
150~250	2.1	1.7	0.72	0.49	1.18	1.08	0.93

【0018】表1では、捕捉1は、捕捉1バンドに関するIR補正反射率データであり、検出バンド1は、検出バンド2に関するIR補正反射率データであり、捕捉1/検出1は、検出1で割った捕捉1のK/S変形データであり、アルゴリズム1は、式：

【0019】

【数5】

$$C = \{ \text{捕捉バンド } 2 / \Sigma \text{ 捕捉バンド} \} * \text{ABS}(2-C)$$

【0020】(式中、ABSは数の絶対値を示す)であり、式中、Cは、式：

【0021】

【数6】

$$C = 100 * (1 + \Sigma(\text{検出バンド}) / \Sigma(\text{試薬バンド}))$$

であり、全/捕捉1は、式：

【0022】

【数7】

$$\Sigma(\text{全バンド}) / \text{捕捉バンド1}$$

である。

【0023】この例示において、検出バンド性能は、DPD濃度が上がるにつれて減少するのに対し、より大きい信号変化は、捕捉バンドに関して顕著である。いかなるアルゴリズムに関しても、アッセイに最も重要である領域においてSN比が最大となるように反射率値を偏らせることが目標である。FOM解析を用いることによりこれを達成することができ、アルゴリズム1は、低分析

\*このフォーマットは示す。2日間にわたり、3種類の異なったCLINITEK(登録商標)50反射率計を用いてデータを取った(各分析対象物レベルに関し、N=18を表す)。表1は、様々なバンド反射率変化量のDPDレベルと、様々な反射率変化量の使用と、様々なアルゴリズムの使用との間の最小感度(FOM)の相違を示す。FOMは、 $(Avg1 - Avg2) / (SD1 + SD2)$ で計算される(式中、Avg1及びAvg2は分析対象物レベル1と分析対象物レベル2に関する平均測定値であり、SD1及びSD2は、分析対象物1と分析対象物2に関する平均値の標準偏差である)。

【0017】

【表1】

対象物濃度において2個の捕捉バンドがより大きい相違となるように偏るように構築される(ここで、この相違は、高分析対象物濃度において、全体にわたる捕集バンドの偏りの中で最も大きい)。アルゴリズム1の別の目標は、多くの免疫アッセイで使用される共通の4個のパラメーター当てはめ値に当てはめることを可能にするように、この偏りを置くことである。

【0024】アルゴリズム開発における第二のステップは、容易に当てはめられうる、かつ値間に正確な分析対象物濃度を与える式を使用することである。FOMは2種の異なる分析対象物レベルを区別するための好適な方法であるが、曲線の形に関する如何なる情報も与えない。ある特定のアッセイの化学を模倣する分析法を使用することが、しばしば最も好適なアプローチである。免疫アッセイに関し、これはしばしば4個のパラメーター当てはめ式である。すべての当てはめ式及びアルゴリズムに関する試験は、様々な分析対象物濃度を有するランダム試料の使用並びに誤差(%CV)及び偏りの計算である。目標は、アッセイの予期される範囲を通して、最小の偏りを有する最も低い%CVを探すことである。2種の分析法に関する尿中のDPD結果0~250nM/mMの比較を、表2及び3に示す。この例示では、3個のバンドを有する免疫試験片を用いた。

【0025】

【表2】

表 2

アルゴリズム1 結果

予 想 値	DPD	標準偏差	変動係数(%)	偏り	DPD/クレアチニン	標準偏差	変動係数(%)
0	2.8	2.8		2.8	0.64		
10	13.2	2.4	18.2	3.2	2.82	0.61	21.6
25	28.1	5.0	17.8	3.1	4.06	1.06	26.1
50	49.2	4.8	9.8	-0.8	5.69	0.5	8.8
75	75.5	9.25	12.3	0.5	6.11	0.7	11.5
150	164.2	25	15.2	14.2	9.77	1.36	13.9
250	227	23.6	10.4	-23	8.41	0.89	10.6

【0026】

\* \* 【表3】

表 3

全 /P1 結果

予 想 値	DPD	標準偏差	変動係数(%)	偏り	DPD/クレアチニン	標準偏差	変動係数(%)
0	0.7	2.47		0.723	0.03		
10	10.7	2.34	22.0	0.663	2.2	0.56	25.5
25	27.4	5.51	20.1	2.383	3.93	1.18	30.0
50	51.6	4.59	8.9	1.598	5.78	0.49	8.5
75	80.3	9.99	12.4	5.33	6.29	0.905	14.4
150	158.8	15.9	10	8.807	8.98	1.05	11.7
250	205.6	31.1	15.1	-44	7.38	1.22	16.6

【0027】表2及び3のデータから、この特定の分析に関し、最初のアルゴリズムは、すべてのDPD値において殆ど誤差を有しない(%CVで測定)。この例は、正確なアルゴリズムを見出すための幾分経験的な方法を示す。選択したアルゴリズムは、与えられた試験片及びフォーマット並びに分析対象物に対する与えられた臨床範囲に関し、それと関連した最も低い誤差を有するものである。

【0028】標的分析対象物に関する値が得られた後、装置は、第二の分析対象物に関する、一以上の波長での試薬パッドの反射率値を用い、流体試料中のこの分析対象物の濃度を決定する。DPDが標的分析対象物でありクレアチニンが第二の分析対象物である場合、精度（又はSN比の減少）は両分析対象物に関するアッセイに重要である。高レベルの精度がない場合、その結果の誤差は、DPD/クレアチニン比における2倍弱の増加は

「通常」と「骨粗しょう症状態」の間で生ずるので、殆ど医学的重要性をもたない試験を招くであろう。第二の分析対象物は、第一の分析対象物と臨床的に関連する体液中のこれら物質から選択される。第二の分析対象物の最も著名な例はクレアチニンであり、クレアチンが筋収縮のエネルギー源として使用されるクレアチンリン酸となる場合の最終代謝産物である。生産されるクレアチニンは、腎糸球体により濾過され、その後再吸収なしに尿中に排泄される。尿アッセイの感度を上げ、尿希釈という結果を招く高尿フローレートの問題を最小化するために、分析対象物/クレアチニン比が尿蛋白アッセイで使用され、尿濃度を標準化する。通常のクレアチニンアッセイには、高pH、通常は11.5～12.5の範囲で行

うアルカリ性Jaffe and Benedict-Behre法を含む。最近、シトレート、過酸化水素及び酸素フリーラジカルや擬ペルオキシドの存在下で色応答を供する酸化性染料の存在下で、尿試料を第二銅イオンと接触させるクレアチニンアッセイが開発された。この方法は、米国特許第5,374,561号明細書に詳細に記載されている。クレアチニンの定量はまた、国際公開第96/34271号パンフレットに記載されているように、免疫学的にも達成されうる。これら第二の分析対象物（その体液試料中の濃度は、臨床的に標的分析対象物の濃度に関連する）は、尿中のクレアチニンに限定されず、また、尿は、本発明の方法により検定されうる唯一の体液ではない。このように、例えば、試験される体液が全血であり、第一の（標的）分析対象物がHbA<sub>1c</sub>であり、第二の分析対象物が全ヘモグロビンであってもよい。HbA<sub>1c</sub>の見掛け濃度を全血の全ヘモグロビン濃度に調節し、HbA<sub>1c</sub>アッセイにおける偏りを排除することができるからである。静脈投与されたイヌリンは、クレアチニンのように腎臓流の指標である。血清学基礎アッセイにおいて、第一の分析対象物は、全前立腺特異的抗原であり、第二の分析対象物が遊離型の前立腺特異的抗原であってもよい。それらの濃度が臨床的に関連する他の分析対象物の対は、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)であり、これらは広くヒト組織に分布している。ALT及びASTの両方は、通常、ヒト血漿、胆汁及び唾液中に存在する。ウイルス性肝炎及び他の形態の肝臓疾患の場合、黄疸のような疾患の臨床的なサインが現れる前でさえ、AST及びALTのレベルが上昇する。毒

性又はウイルス性肝炎においては、ALTはASTと同等又はより高く、通常は1未満であるALT/AST比は、1に近づくか超える。更に、心筋梗塞後はAST濃度は上昇し、これによりこれら2種の酵素の比とそれらの活性が変化する。このように、臨床的に重要な結果を、血清中のこれら2種の分析対象物の比を決定することにより得ることができる。

【0029】多くの臨床的に重要な標的分析対象物は尿中に存在し、本発明により測定されうる。これらにおいて、分析対象物は、デオキシビリジノリン(DPD)、ヒト血清アルブミン、乱用薬物、例えばアンフェタミン類/バルビツエート類/コカイン、臨床的に重要な蛋白質マーカー、例えば前立腺特異的抗原、腎臓疾患蛋白質、例えば乳酸デヒドロゲナーゼ、N-アセチル-β-D-グルコサミンダーゼ、妊娠又は受胎関連ホルモン、例えばヒト絨毛性ゴナドトロピン、ろ胞刺激ホルモン及び黄体形成ホルモン、尿路感染のマーカー、例えばタム・ホースフォール蛋白質又はリポ多糖、β<sub>2</sub>ミクログロブリン、アミラーゼ又はクラミジアリポ多糖である。感染を評価するために1gA/1gGの比を決定することは、本発明により達成されうる。実測クレアチニン濃度に対してこれら見掛け濃度を比率化することにより腎臓流中の変動に関しこれら見掛け濃度を補正することは、測定の精度を上昇させる。

【0030】展開した試験片からの信号を検出する手段は、標識化結合パートナーに結合した検出可能な標識に依存するものの、標識の検出可能な物理特性がスペクトルの可視又は赤外領域での所定波長における光反射率である場合には、反射率計の使用が一般である。所望の実施態様において、例えば検出器の読み取りヘッドの下で横方向に移動させることができる試験片用の試料テーブルの使用により、試験片又は反射率計の検出要素を、互いに対して動かす手段を有する反射率計が提供される。この技術は、反射率計の検出手段に対して正確に配置されていない試験片領域における正確な定量を提供することを支援する。特に、検出器に対する試験片の位置は、マイクロプロセッサの制御下に置くことができ、それにより、試験片の第二、第三又は第四領域並びにこれら領域内の個々のバンドが、個々に検出されうる。

【0031】

【実施例】本発明を实践する方法を、以下の実施例でより詳しく説明する。

#### 実施例1

長さ4インチ(101.6mm)で幅0.2インチ(5.0mm)のポリスチレン指示体上で一緒にした6個の別個の領域を有する、クレアチニン及びデオキシビリジノリン(DPD)を測定するための試験片を図1に示す。図1を参照すると、領域1は、サイズが0.2×0.2インチであるクレアチニンパッドである。クレアチニンの比色測定に適合させるために、クレアチニンパッドを以

下のように準備した：30mM硫酸銅、50mMシトレート、750mMグリセロール-2-ホスフェート、0.2%ヘキサンスルホン酸、50mMフィチン酸及び0.2%ドデシルスルホン酸ナトリウム(SDS)を含有するpH6.94の溶液中に、0.2インチ深までワットマン(Whatman)3mmフィルター紙を含浸させることにより最初に処理した。乾燥後、33mM3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、73mMジイソプロピルベンゼンジヒドロペルオキシド、63mMトリイソプロパノールアミンホウ酸塩、0.5%plasonde及び0.032%エチルオレンジを含有する溶液中に、試験片を含浸させた。試験片をクレアチニンを含有する水性媒体と接触させる際に生じる色応答の強度は、クレアチニン濃度に比例する。領域2は緩衝剤パッドであり、0.5~1Mグリシンと175~350mM尿素で、ワットマンF075-07ガラス繊維を含浸させることにより調製した。得られたパッドのサイズは0.2×0.5インチ(12.7mm)である。この緩衝剤パッドは、尿試料のpHを所望の値に緩衝する目的に役立つ。例えば、尿のpHは4.5~8の範囲にあり、緩衝剤パッドは、抗原/抗体結合反応に有利なように、pH>7に試料を維持するために使用されうる。クレアチニンパッド1と緩衝剤パッド2間には、クレアチニン試薬を緩衝剤パッド試薬から隔離するために、0.1インチ(2.5mm)の間隔がある。領域3は金ゾルー-DPD抗体パッドである(分析対象物に対して特異的である標識化結合パートナーを含有する第一領域)。領域4及び5は免疫クロマトグラフィー展開領域であり、ここに、捕捉及び検出試薬が、0.2×1.25インチ(31.75mm)のサイズを有するニトロセルロースの一片上に沈着している。領域4は、3個の捕捉バンド(固定化分析対象物を含有する第二領域)を含み、カルボキシル末端ポリエチレングリコールに固定されたDPDを有し、バンド当たり約0.059インチ(1.5mm)の幅を有し、また、バンド間の間隔は0.2インチ(中心から中心)である。第三の捕捉バンドの中心から0.2インチにおいて、抗IgG捕集バンドからなる領域5があり(未反応の標識化結合パートナーを固定化するための第三領域)、バンド幅は約0.059インチ(1.5mm)である。捕集バンドの上0.2インチにおいて、吸収パッド6があり、0.2インチ×0.5インチ(12.7mm)のサイズである試験片のニトロセルロース領域から移動する液体を吸収するように機能する。

【0032】アッセイを実施するため、試験溶液、すなわち測定されるべきDPD分析対象物を含有する尿試料に試験片を3秒間浸すが、この際に、クレアチニンゾーン及び緩衝剤パッドのみが試験溶液の表面より下になるような深さで浸し、試験溶液が捕捉領域の捕捉バンド、検出領域の第一のバンドを通して吸収パッドへ毛管作用により試験片を上昇することを可能にする。3秒浸漬の

後、CLINITEK（登録商標）50反射率分光計の読み取りテーブル上に試験片を配置し、計器のスタートボタンを押した。クレアチニンパット反射率を3分間記録し、免疫DPD試験片（全4バンド）の反射率を測定し、3分間記録した。DPDアッセイに関する反射率信号をIR及び緑色フィルターで測定した一方、クレアチニンアッセイに関する反射率を赤色及び緑色フィルターで測定した。計器は、式1～5により導出されるデコード値における応答を供する。

【0033】

【数8】

式 1

$$\text{クレアチニンに関するデコード} = \frac{[R]_{\text{green}}}{[R]_{\text{red}}}$$

【0034】式中、 $[R]_{\text{green}}$ は緑色フィルターで測定した反射率であり、 $[R]_{\text{red}}$ は赤色フィルターで測定した反射率である。

【0035】DPDアッセイに関し、バンド応答信号を表4で示すように指定した。

【0036】

【表4】

表 4

DPDアッセイに関するバンド信号指定

バンド番号	タイプ	指 定
1	捕捉バンド 1	P1
2	捕捉バンド 2	P2
3	捕捉バンド 3	P3
4	捕集バンド 1	P4

【0037】緑色フィルターでの反射率を、IRフィルターでの反射率に対して比率化し、高さや表面変動のような試験片間での変動からの誤差を減少させる。IR波長での反射率は、バンドの金ゾル強度に関わらず、ほぼ一定値を保つ。補正反射率 $[R_n]$ は、式2に従って計算される。

【0038】

【数9】

式 2

$$[R_n] = \frac{[Rn]_{\text{green}} \times 65}{[Rn]_{\text{IR}}}$$

【0039】式中、 $n$ はバンド数1、2、3又は4であり、 $[Rn]_{\text{green}}$ は緑色フィルターでのバンド $n$ の反射率であり、 $[Rn]_{\text{IR}}$ はIRフィルターでのバンド $n$ の反射率である。数65は割り当てられた補正反射率値であるが、これはIRフィルターでの反射率%が約65%であるからである。

【0040】IR補正反射率値である $[R_n]$ は、その後式3に従って $K/S$ に変換され、各バンドに関するバンド応答信号を供する。

【0041】

【数10】

式 3

$$\text{バンド信号} = P_n = \frac{(1 - [R_n])^2}{2 \times [R_n]}$$

10

【0042】式中、バンド信号 $P_n$ は、 $K/S$ 変換反射率値 $[R_n]$ である。

【0043】各バンドの応答デコードは、最終的に式4に従って計算される。

【0044】

【数11】

式 4

$$\text{DPDアッセイに関するデコード} = \frac{T}{P_1}$$

20

【0045】式中、 $T$ はすべてのバンドに関するバンド信号の合計である（式5）。

【0046】

【数12】

式 5

$$T = \sum_{n=1}^N P_n$$

30

【0047】式中、 $N$ は捕捉バンド及び捕集バンドの合計数、本実施例では4であり、 $P_n$ はバンド信号 $n$ であり、 $n$ は1、2、3又は4である。

【0048】DPD及びクレアチニンに関する標準曲線を、6レベルの分析対象物濃度を含む校正物質を用いて得た。標準曲線の例を、DPDアッセイに関しては図2に、クレアチニンアッセイに関しては図3に示した。尿試験試料に関するDPD及びクレアチニン濃度を、DPD及びクレアチニン標準曲線からそれぞれ計算した。その後、 $\text{nM/mM}$ でのDPD/クレアチニン比を、以下の計算のように、尿試料Aに関して計算した。

【0049】DPD標準曲線から計算されたDPD濃度 = 123 nM

クレアチニン標準曲線から計算されたクレアチニン濃度 = 10.2 mM

DPD/クレアチニン比 = 123 nM / 10.2 mM = 12.1 nM/mM

【0050】高い骨吸収状態を決定するための境界値（cutoff）は、DPD/クレアチニン比7.4 nM/mMである。7.4未満が正常であり、7.4を超える場合は

50

高い骨吸収状態である。それゆえに、本例において、その結果は高い骨吸収状態を示している。第二の尿試料を同様の方法で分析し、以下の結果を得た：

DPD濃度=123 nM

クレアチニン濃度=20.5 mM

DPD/クレアチニン比=6.0 nM/mM

【0051】DPD濃度は同じであるが、クレアチニンに対するDPDの比は、低い骨吸収状態を示している。

【0052】様々な量のDPDとクレアチニンを含有する尿試料を用いて、上記手順で5回試験した。予想比、実測比、標準偏差、変動係数(%)及び+/-偏りを表5に示す。表5から、3個のレベル(DPD/クレアチニン=4.52、7.54、12.07 nM/mM)において、変動係数が12%未満である精度が得られた。

【0053】

【表5】

表 5

DPD/クレアチニンアッセイ性能

予 想 値 DPD/クレアチニン nM/mM	実 測 値 DPD/クレアチニン nM/mM	実 測 値		
		標準偏差	変動係数(%)	偏り nM/mM
4.52	4.29	0.50	11.6%	-0.23
7.54	7.59	0.89	11.7%	0.05
12.07	12.04	1.38	11.5%	-0.03

平均変動係数(%) = 11.9%

【0054】金ゾル標識化抗体は、試験片の捕捉及び捕集ゾーンで視覚的に観察可能であるが、臨床的に意味のある結果は、反射率計の使用を通してのみ得ることができる。これは、試験片の全長にわたるマルチバンドの使用による場合である。加えて、バンド信号は、様々な波\*

表 6

応答信号 = バンド比率化アルゴリズム [T/P<sub>1</sub>]

予 想 値 DPD/クレアチニン nM/mM	実 測 値 DPD/クレアチニン nM/mM	実 測 値	
		標準偏差	変動係数(%)
4.15	4.23	0.53	12.5
8.09	8.10	0.28	3.5
10.37	10.44	1.16	11.1

【0060】

\*長(赤外、緑及び赤)において、これら波長における反射率を測定及び記録する能力をもつ装置を用いる反射率測定を要する。反射率測定値は、装置のソフトウェアを用いて、所定のアルゴリズムに基づき比率化される。更に、分析対象物濃度は、装置内に保存されている標準曲線を用いて決定され、DPD/クレアチニン比は装置内にセットアップされたソフトウェアを用いて計算される。

【0055】前記実施例において、DPDアッセイに関する最終応答信号(デコード)は、アルゴリズムデコード=[T/P<sub>n</sub>] (式中、Tは4個すべてのバンドからの信号の合計であり、P<sub>n</sub>はバンド1のバンド信号である)を用いて決定された。このアルゴリズムの使用はアッセイの精度を高めるが、これは、バンド信号を比率化することが、装置間の変動による誤差のような系統的誤差を減じるためである。別のアルゴリズムは、最終応答信号を決定するために使用されうる。本例における応答信号は、式：

【0056】

20 【数13】

応答信号 = [T/ 捕捉バンド 1]

又は [T/P<sub>1</sub>]

【0057】(式中、すべてのバンド信号は、K/S変形反射率値であり、Tは捕捉バンド及び検出バンドの合計である)のように決定される。

【0058】バンド比率化を用いる利点は、表6及び7のデータにより示される。これら表から、捕捉ゾーンからの信号のみを用いて得ることができる精度より大きい精度で、試験片がDPD濃度を測定することができるということが確認できる。

【0059】

【表6】

【表7】

表 7

応答信号 = 捕捉ゾーン  $[P_1]$  (バンド比率化なし)

予 想 値 DPD/クレアチニン nM/mM	実 測 値		
	DPD/クレアチニン nM/mM	標準偏差	変動係数 (%)
4.15	2.84	4.1	144
8.09	7.74	0.46	6.0
10.37	10.99	2.0	18.5

【0061】あるいはまた、最終応答信号は、式： \* 【0064】

【0062】 10 【数15】

【数14】

【捕捉バンド 1/ 検出バンド 1】

応答信号 = 【検出バンド / 捕捉バンド】

【0063】(式中、すべてのバンド信号はK/S変形反射率値である)のように計算されうる。更にはまた、試験片が複数の捕捉バンド及び検出バンドを含む場合、最終応答信号は、式：

\* 【数16】

応答信号 =  $[W_{cap} * \text{捕捉バンド } 1 / W_{det} * \text{検出バンド}]$

【0067】(式中、すべての信号は反射率値であり、 $W_{cap}$ 及び $W_{det}$ は、捕捉バンドと検出バンドを別々に重みづけする重みづけ関数である)を用いる工程を含む。このように、非常に多くのアルゴリズムを、最終応答信号を決定するために用いる。

【0068】試験片の第二(捕捉)領域に固定された標識化結合パートナーからの信号と、第三(検出)領域に固定された標識化結合パートナーからの信号とを比率化することによる応答信号の計算は、SN比を引き下げるによりアッセイの精度を上げることに重要である。この高められた精度は、DPD/クレアチニン比のわずか2倍の増加が、正常と疾病を示す骨粗しょう症※30

※状態との間で生じるので、臨床的意義をもつ検査にとり重要である。

【0069】本発明において達成されうる、分析結果における更なる改良の証拠を、表8～10に示す。これらの表は、同じデータセットを用いて得られたが、3個の異なったアルゴリズム(バンド比率化をしている【T/P<sub>1</sub>】、IR補正及びバンド比率化をしていない第一捕捉バンドの反射率(%)、及び、バンド比率化をしていないがIR補正をしている第一捕捉バンドの反射率(%))を比較した。

【0070】

【表8】

表 8

【T/P<sub>1</sub>】バンド比率化アルゴリズムを用いた性能

予 想 値 DPD, nM	実測値 DPD, nM					予 想 値 DPD/クレアチニン nM/mM	実測値 DPD/クレアチニン nM/mM				
	平 均	標準偏差	変動係数(%)	偏 り	偏り(%)		平 均	標準偏差	変動係数(%)	偏 り	偏り(%)
11	12.3	2.0	16.13	1.29		4.1	4.2	0.7	16.71	0.08	1.97
33	29.6	2.8	9.44	-3.35	-10.16	1.7	1.4	0.2	13.36	-0.21	-12.71
72	70.8	4.3	6.11	-0.66	-0.93	8.1	8.1	0.2	2.68	-0.01	-0.17
110	116.8	2.0	1.74	6.85	6.22	20.7	23.1	0.6	2.77	2.34	11.28
165	159.9	9.3	5.80	-5.14	-3.12	12.4	12.4	0.9	6.87	-0.05	-0.37
275	275.8	12.7	4.61	0.78	0.28	10.4	10.6	1.2	10.94	0.22	2.08
	平 均	5.54			-1.54		平 均	7.32			0.35

注：第一レベルは平均値計算から除外

【0071】

【表9】

表 9

IR補正及びバンド反射化をしていない捕捉バンド1の反射率(%)を用いた性能

予 想 値		実測値 DPD, nM					予 想 値		DPD/クレアチニン nM/nM				
DPD, nM	平 均	標準偏差	検定係数	偏 り	偏り(%)	比	平 均	標準偏差	検定係数	偏 り	偏り(%)		
11	7.5	10.3	138.26	-3.55		4.1	2.9	4.1	143.86	-1.30	-31.29		
33	38.3	14.9	38.90	5.30	16.06	1.7	1.9	0.8	42.11	0.24	14.52		
72	69.7	4.6	6.60	-1.80	-2.52	8.1	7.9	0.5	6.33	-0.19	-2.33		
110	114.9	10.9	9.49	4.90	4.45	20.7	21.7	2.0	9.22	0.96	4.64		
165	159.1	20.1	12.63	-5.90	-3.58	12.4	12.0	1.3	10.83	-0.44	-3.56		
275	264.3	27.7	10.48	-10.70	-3.89	10.4	10.0	1.6	16.00	-0.37	-3.56		
		平 均	15.62		2.11			平 均	16.90		-3.60		

注：第一レベルは平均値計算から除外

【0072】

\* \* 【表10】

表 10

バンド比率化をしていないがIR補正をしている  
第一捕捉バンドの反射率(%)を用いた性能

予 想 値		実測値 DPD, nM					予 想 値		DPD/クレアチニン nM/nM				
DPD, nM	平 均	標準偏差	検定係数	偏 り	偏り(%)	比	平 均	標準偏差	検定係数	偏 り	偏り(%)		
11	7.4	10.1	136.49	-3.60		4.1	2.8	4.1	146.43	-1.35	-32.49		
33	38.8	13.4	34.54	5.80	17.58	1.7	2.0	0.7	33.00	0.34	20.55		
72	68.2	1.4	2.05	-3.30	-4.62	8.1	7.7	0.5	6.49	-0.39	-4.80		
110	116.9	7.1	6.07	6.90	6.27	20.7	22.0	1.2	5.45	1.26	6.08		
165	152.2	16.0	10.11	-4.80	-4.12	12.4	11.9	0.9	7.56	-0.54	-4.37		
275	282.8	40.6	14.06	13.80	5.02	10.4	11.0	2.0	12.18	0.63	6.08		
		平 均	13.37		4.03			平 均	14.54		-1.49		

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る試験片である。

【図2】DPDアッセイに関する標準曲線である。

【図3】クレアチニンアッセイに関する標準曲線である。

【符号の説明】

※ 1 クレアチニンパット

2 緩衝剤パット

3 金ゾルー-DPD抗体パット

30 4 捕捉バンド

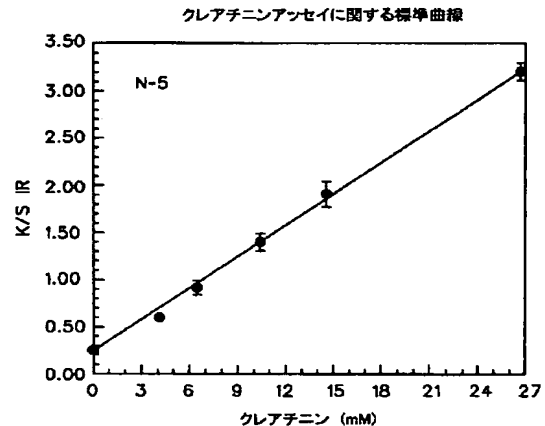
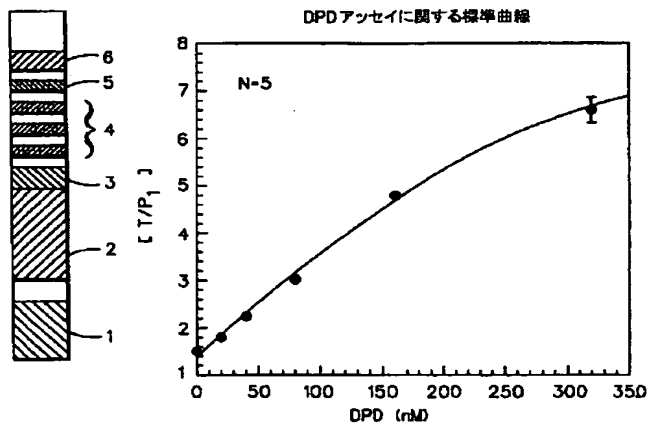
5 抗IgG捕集バンド

※ 6 吸収パット

【図1】

【図2】

【図3】



## フロントページの続き

(72)発明者 キャロル・エー・ミラー  
アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、  
エルクハート、ワインディング・ウォータ  
ー・レーン・ノース 51101  
(72)発明者 ダヤウェーラ・ウィエスリヤ  
アメリカ合衆国、インディアナ州、46530、  
グレンジャー、バリーノール・ウェイ  
17186

(72)発明者 メイタク・テレサ・イップ  
アメリカ合衆国、インディアナ州、46516、  
エルクハート、イースト・ジャクソン・ブ  
ールバード 2220  
(72)発明者 クリス・ティール・ジマール  
アメリカ合衆国、インディアナ州、46516、  
エルクハート、シーダー・ノール・サーク  
ル 23675